



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Estratégias bionanotecnológicas para produção e liberação controlada de peptídeos antimicrobianos

JULIANE FLÁVIA CANÇADO VIANA

Orientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

Co-orientadora: Profa. Dra. Simoni Campos Dias

Brasília, 2014.



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Estratégias bionanotecnológicas para produção e liberação controlada de peptídeos antimicrobianos

JULIANE FLÁVIA CANÇADO VIANA

Orientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

Co-orientadora: Profa. Dra. Simoni Campos Dias

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

Brasília, 2014.

Trabalho desenvolvido no Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas da Universidade Católica de Brasília, sob a orientação do Prof. Dr. Octávio Luiz Franco e co-orientação da Profa. Dra. Simoni Campos Dias. Este trabalho teve o apoio financeiro da CAPES.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que aprenderam com Jó a terem paciência comigo durante estes quatro anos e meio, e contribuíram para a sua realização.

AGRADECIMENTOS

Venho, durante uns dias, pensando em como agradecer à pessoas que estão comigo durante essa jornada. Interessante, que acredito ser aqui, a única seção desta tese em que tenho autonomia para escrever por minha conta e risco (rs), sem ter que passar pelo crivo detalhado dos meus orientadores. Assim, não quero fazer um agradecimento nos moldes formais de uma tese, e sim pela forma que vejo os amigos que já estavam comigo antes do doutorado e os amigos que entraram em minha vida por causa do doutorado. Então vamos lá!

Primeiro, a minha família.. pra falar a verdade, nem sei o que falar deles... meus pais, Alberto e Regina, meus irmãos, Pimpa e Pistilento, meu sobrinho Rodrigo, e meus companheiros de todos os dias Milho e Pepeca. Acredito que todos eles saibam da sua importância na minha vida e como me sinto acolhida, compreendida e apoiada. Entendo que muitas vezes, esse período também foi difícil para eles, mas mesmo assim eu estava lá, me apoiando sobre eles.

Quero agradecer a Deus e à fé que sinto dentro de mim. Sem eles tudo seria mais difícil. Quero agradecer às almas também... elas me ajudam a dormir quando estou com a cabeça cheia de coisas.

Aos amigos que conheci antes do doutorado, muito obrigada! A decisão de fazer o doutorado e deixar os meus empregos para me dedicar exclusivamente a esta nova etapa, vocês sabem que foi pensada para a realização de um sonho que está agora se concretizando. Agradeço também à ausência compreendida, ao sumiço e também por saber que vocês sempre estarão aí, cada um em seu devido lugar, para uma gargalhada, um choro, uma conversa séria e, também, uma conversa fiada.

À minha família brasileira Milady mãe, Milorde e Milady filha! Vocês são o meu suporte e referência familiar aqui em Brasília. Sinto-me acolhida, querida e parte integrante da família. Graças a Milady mãe, conheci minha orientadora e amiga Simoni.

Agora, quero falar dos amigos que vieram junto com o doutorado:

- A primeira de todas é a Simoni, que me aceitou e me apoiou. Já disse a ela o quanto sou grata e da sua importância e amizade durante estes anos. As pessoas até falam que sou filha dela!! Deve ser na desorientação!!!

- Ao meu orientador, prof. Octávio Luiz Franco, por abrir as portas do laboratório e me aceitar como aluna mesmo sabendo que seria um desafio.
- Às irmãs Maria Cecília, Ana Cláudia, Ana Zotta e Amanda. Além de agradecer a amizade de vocês, quero agradecer por vocês terem entrado e fazerem parte da minha vida.
- Aos amigos do CAPB que aguentaram todos os meus desabafos e também contribuíram para esse trabalho com suas opiniões, ideias e companheirismo. Um agradecimento especial para Camila, Michele, Ezequiel e Loiane que, além disso tudo, ainda me ajudaram botando a mão na massa junto comigo.
- Aos amigos do Cenargen: Lílian, Lídia, Bibi, Nicolevisk, Cíntia, Valks, Abuduzito, André, Primo e Pedrão do matinho. Obrigada pelas conversas, pelos chopps, pelos desabafos e amizade.
- Ao Dumocó e à Maricota por estarem junto comigo durante estes quatro anos e meio. Vocês dois sabem da contribuição de vocês na concretização desse trabalho.
- Aos amigos de Boston: Margareth, Erika, Yan, Jaquita e Mary. Vocês foram minha família durante minha temporada em Boston e fizeram tudo parecer mais fácil do que realmente foi.

Espero ter contemplado todos com a minha gratidão e poder fazer o mesmo por vocês!

Finalmente, quero agradecer aos professores da banca por terem aceitado o meu convite.

À CAPES pelo suporte financeiro aqui e nos Estados Unidos.

“Education is the most powerful weapon which we can use to change the world.”

Nelson Mandela.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPs – Peptídeos antimicrobianos

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BSA – Albumina bovina sérica

CAMPs – Peptídeos antimicrobianos catiônicos

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CIM - Concentração inibitória mínima

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DTT – Ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ELP – *elastin like protein*

IRaS – Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

HAIs – *Healthcare Associated Infections*

IPTG: Isopropil- β -D-galactopiranoside

Kb: quilo-base

kDa – kilodaltons

KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

LPS– Lipopolissacarídeo

MALDI-TOF MS - *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass spectrometry*.

ME – Membrana externa

MI – Membrana interna

MIC – Concentração inibitória mínima

MRSA - *Staphylococcus aureus* multi-droga resistente

MSP - *Main spectrum projection dendrogram*

OD – Densidade óptica

PAMs – Peptídeos antimicrobianos

Pb – par (es) de base

PBS – Tampão fosfato salina

PRG – Proteína rica em glicina

PIC – Coquetel de inibidor de proteases

PSA – Persulfato de amônio

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RPM - Rotações por minuto

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

UFC - Unidade formadora de colônia

UTI - Unidades de Terapia Intensiva

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

WHO – *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modos de interação dos PAMs com as membranas celulares. Adaptado de Nguyen <i>et al.</i> , 2011.	26
Figura 2. Desenho esquemático representando um <i>electrospinning</i>	39
Figura 3. Alinhamento do Pg-AMP1 e sete outras proteínas ricas em glicina de plantas e colicina E3 de <i>E. coli</i>	46
Figura 4. Cassete de expressão do Pg-AMP1 no vetor pQE30..	50
Figura 5. Casste de expressão contendo a sequência do <i>pg-amp1</i> sintético que foi clonado no vetor PBSK sob controle do promotor T7..	52
Figura 6. Cassete do vetor de recombinação pDONR207-K-6His-Pg-KDEL.	53
Figura 7. Cassete do vetor de recombinação pDONR207-6His-Pg.	54
Figura 8. Cassete do vetor de expressão em bactéria pDEST15-GST-6His-Pg.....	55
Figura 9. Fluxograma esquemático das construções utilizadas para clonagem e expressão do Pg-AMP1 em <i>E. coli</i> e <i>N. benthamiana</i>	58
Figura 10. Cassetes de expressão dos vetores virais de expressão em planta..	59
Figura 11. Cassetes de expressão do vetor binário pCambia..	60
Figura 12. Cassetes de expressão do vetor binário pK7GWF2.....	61
Figura 13. Gel de agarose 1% confirmando a clonagem do inserto no vetor pQE30.	64
Figura 14. Membrana de PVDF expressão de proteína recombinante com o vetor pDEST15-GST-Pg em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS com anticorpo anti-His..	70
Figura 15. SDS-PAGE 15 % corado em <i>coomassie</i> mostrando o processo de purificação do Pg-AMP1.....	72
Figura 16. Gel de agarose 1 % com amplificação do gene da proteína N por PCR usando os oligos iniciador e terminador da proteína N..	75
Figura 17. Gel de agarose 1 %. Confirmação da clonagem da proteína N de 750 pb no pENTRY11-6His-Pg.	75
Figura 18. Membrana de PVDF incubada com anticorpo policlonal anti-GFP (1:5000).	78
Figura 19. Membrana de PVDF incubada com anticorpo policlonal anti-GFP (1:5000) e anticorpo policlonal anti-N.....	79
Figura 20. Membrana de PVDF incubada com anticorpo policlonal anti-GFP (1:5000)	80
Figura 21. Estrutura tridimensional do Cm-p1.....	84
Figura 22. Análises de espectrometria de massa do (a) Cm-p1 livre, (b) Cm-p1-PVA incorporado nas nanofibras e (c) nanofibras sem o peptídeo.	95
Figura 23. Imagens de SEM and AFM das fibras PVA e Cm-p1-PVA.....	96

Figura 24. Perfil de liberação do Cm-p1 das nanofibras Cm-p1-PVA.....	99
Figura 25. Biocompatibilidade das nanofibras contendo o peptídeo antimicrobiano Cm-p1.	101
Figura 26. Avaliação da secreção das citocinas pró-inflamatórias (a) TNF- α e (b) IL6 por macrófagos RAW 264.7 após 24 h de exposição às PVA e Cm-p1-PVA nanofibras por ELISA.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Microrganismos mais freqüentes nas IRaS.	21
Tabela 2. Peptídeos antimicrobianos em fase clínica de desenvolvimento.	29
Tabela 3. Listagem dos parâmetros que podem interferir no processo de <i>electrospinning</i> e os respectivos efeitos que podem causar na morfologia e diâmetro das fibras.	40
Tabela 4. Exemplos de nanofibras produzidas por <i>electrospinning</i> utilizadas em sistemas de liberação controlada.	41
Tabela 5. Atividade do Pg-AMP1 recombinante e da GST isolada.	73
Tabela 6. Lista contendo as respectivas quantificações do Cm-p1 após 24 h de liberação e as medidas do raio de inibição em meio ágar Sabouraud dextrose contra <i>C. albicans</i> ATCC 10231.	99

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Infecções relacionadas aos serviços de saúde (IRaS).....	19
1.1.1	Infecções fúngicas causadas <i>Candida</i> sp.....	22
1.2	Peptídeos antimicrobianos.....	24
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
1.3	Expressão heteróloga.....	30
1.3.1	Expressão heteróloga em <i>E. coli</i>	31
1.3.2	Expressão transiente em <i>Nicotiana benthamiana</i>	33
1.4	Nanobiotecnologia.....	35
1.4.1	Antimicrobianos em sistemas de liberação controlada.....	37
1.4.2	Nanofibras como sistemas de liberação controlada de fármacos	38
2	ESCOPO DA TESE	43
	CAPÍTULO 1 – EXPRESSÃO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO Pg-AMP1 EM <i>ESCHERICHIA COLI</i> E <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i>	44
1	INTRODUÇÃO	45
2	JUSTIFICATIVA.....	47
3	HIPÓTESE.....	48
4	OBJETIVO GERAL	49
4.1	Objetivos específicos.....	49
5	MATERIAL E MÉTODOS	50
5.1	Expressão do Pg-AMP1 em <i>Escherichia coli</i> – vetor pQE30.....	50
5.1.1	Construção do gene sintético.....	50
5.1.2	Transformação genética e produção de DNA plasmidial.....	50
5.1.3	Expressão do peptídeo recombinante em <i>E. coli</i> linhagem M15.	51
5.1.4	Confirmação da expressão heteróloga.....	51
5.2	Expressão do Pg-AMP1 por <i>GATEWAY</i> em <i>E. coli</i>	52

5.2.1	Construção do gene sintético.....	52
5.2.2	Construção do vetor de clonagem	53
5.2.3	Transformação genética de células de <i>E. coli</i> XL1-blue e extração de DNA plasmidial	54
5.2.4	Expressão heteróloga em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) <i>plysS</i>	54
5.2.4.1	Construção do vetor de expressão e confirmação da expressão heteróloga	54
5.2.4.2	Determinação da solubilidade da proteína expressa	56
5.2.4.3	Purificação da proteína recombinante	56
5.2.4.4	Bioensaios contra bactérias	57
5.3	Expressão do Pg-AMP1 por GATEWAY <i>Nicotiana benthamiana</i>	58
5.3.1	Construção do vetor de expressão, utilizando o vetor viral PVX.....	58
5.3.2	Construção do vetor de expressão, utilizando o vetor binário pCAMBIA.....	59
5.3.3	Construção do vetor de expressão, utilizando o vetor binário pk7GWF2.....	60
5.3.4	Expressão transiente em <i>Nicotiana benthamiana</i>	61
5.3.4.1	Confirmação e análise da expressão heteróloga.....	62
5.3.4.2	Purificação do Pg-AMP1 recombinante de <i>N. benthamiana</i> – pK7GWF2-GFP-N-6His-Pg.	63
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
6.1	Clonagem e expressão do Pg-AMP1 no VETOR pQE30	64
6.1.2	Transformação genética e extração de DNA plasmidial	64
6.1.3	Expressão e confirmação da expressão do peptídeo recombinante	64
6.2	Expressão do Pg-AMP1 em sistema procarioto utilizando o sistema <i>Gateway</i> [®]	68
6.2.1	Construção do vetor de expressão	68
6.2.2	Expressão e confirmação da expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i>	69
6.2.3	Isolamento do peptídeo recombinante	71
6.2.4	Bioensaios contra bactérias patogênicas.....	72

6.3	Expressão heteróloga em <i>Nicotiana benthamiana</i> utilizando o sistema de GATEWAY®	73
6.3.1	Expressão e confirmação da expressão em <i>N. benthamiana</i>	73
7	CONCLUSÃO	81
CAPÍTULO 2 – PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS POR <i>ELECTROSPINNING</i> CONTENDO O PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO Cm-p1 COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA.....		
1	INTRODUÇÃO	83
2	JUSTIFICATIVA.....	86
3	HIPÓTESE	87
4	OBJETIVO GERAL	88
4.1	Objetivos específicos	88
5	MATERIAL E MÉTODOS	89
5.1	Síntese química e análise do peptídeo Cm-p1	89
5.2	Produção das nanofibras por <i>electrospinning</i>	89
5.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	89
5.4	Microscopia de força atômica (MFA)	90
5.5	Perfil de liberação do Cm-p1 das nanofibras	90
5.6	Avaliação antifúngica	91
5.7	Cultura celular	91
5.8	Análise de toxicidade das nanofibras com células humanas	92
5.9	Avaliação da viabilidade/proliferação celular	92
5.10	Produção de espécies reativas de oxigênio por células HUVEC.....	92
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
6.1	Produção das nanofibras de Cm-p1-PVA e detecção do peptídeo	94
6.2	Caracterização microscópica das fibras.....	96
6.3	Perfil de liberação do Cm-p1 das nanofibras	98
6.4	Atividade antifúngica	99

6.5	Biocompatibilidade das nanofibras Cm-p1-PVA com células humanas.....	100
7	CONCLUSÃO	103
8	PERSPECTIVAS	104
9	PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	105
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

RESUMO

Na última década, a urgência na busca de novos e eficientes medicamentos para o combate das infecções hospitalares emergiu, principalmente, em função do desenvolvimento de mecanismos de resistência em microrganismos patogênicos. Neste âmbito, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) surgem como uma potencial classe de substâncias a serem utilizadas na prevenção e controle de infecções por apresentarem múltiplas atividades que incluem tanto atividade bactericida e fungicida, quanto imunoprotetora. Esses peptídeos podem ser encontrados em diversas fontes na natureza como fungos, plantas, animais vertebrados e invertebrados, sendo que diversos estudos já demonstraram serem raros os episódios de resistência aos PAMs. Entretanto, estas moléculas estão presentes em concentrações muito baixas inviabilizando a sua utilização a partir da purificação de fontes naturais ou síntese química dependendo da sua estrutura primária. Dessa forma, a produção desses peptídeos utilizando ferramentas biotecnológicas permite que os mesmos sejam produzidos e empregados em estudos de estrutura-função e mecanismos de ação. A primeira etapa deste trabalho consistiu na produção heteróloga em sistema procarioto e eucarioto do peptídeo Pg-AMP1 utilizando proteínas de fusão, descrito originalmente com atividade antibacteriana. Entretanto, não foi observada atividade da proteína heteróloga fusionada contra nenhuma das bactérias testadas em ensaios *in vitro*, visto que o peptídeo não foi clivado. Paralelamente, o peptídeo Cm-p1, originalmente extraído do molusco *Cenchritis muricatus*, foi sintetizado quimicamente e incorporado a nanofibras para produzir um sistema de liberação controlada. As nanofibras antifúngicas mostraram atividade contra *Candida albicans*, sendo estas caracterizadas por espectrometria de massas, microscopia eletrônica de varredura, bem como microscopia de força demonstrando que a presença do Cm-p1 pode interferir na morfologia das nanofibras. Além disso, os testes de liberação mostraram que Cm-p1 foi quase todo liberado na primeira hora. A biocompatibilidade das fibras foi avaliada por MTS e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) por células HUVEC, mostrando que as nanofibras contendo o peptídeo não afetaram a viabilidade celular. Somente as fibras contendo 10 % do Cm-p1 aumentaram a geração de ROS e a secreção de citocinas como IL6 e TNF- α . O emprego de ferramentas bionanotecnológicas possibilita a produção e incorporação de peptídeos antimicrobianos em sistemas de liberação controlada de fármacos que podem ser utilizados no tratamento e controle de infecções nosocomiais.

Palavras chaves: Pg-AMP1, expressão heteróloga, proteínas de fusão, *Escherichia coli*, *Nicotiana benthamiana*, sistemas de liberação controlada, Cm-p1, nanofibras.

ABSTRACT

In the last decade, the urgency in finding new and effective drugs to avoid hospital infections emerged due to the development of mechanisms of resistance in pathogenic microorganisms. In this context, antimicrobial peptides (AMPs) appear as a potential class of substances to be used in the prevention and control of infections by presenting multiple activities that include both bactericidal and fungicidal activities, as well as immunoprotective. These peptides can be found in nature from various sources such as fungi, plants, vertebrates and invertebrates, and several studies have already demonstrated they are rare episodes of AMPs resistance. However, these molecules are synthesized in very low concentrations precluding their use from natural sources or chemical synthesis. Thus, the production of these peptides using biotechnological tools allows their producing and using in studies of structure-function and mechanisms of action. The first step of this work consisted of heterologous production in eukaryote and prokaryote systems of Pg-AMP1 using fusion proteins. Originally, this peptide was described with antibacterial activity. However, unfortunately the fused heterologous protein was not active against any of the bacteria tested *in vitro*. In parallel, the Cm-p1 peptide, originally extracted from shellfish *Cenchritis muricatus*, was chemically synthesized and incorporated into nanofibers to produce a controlled release system. Nanofibers showed antifungal activity against *Candida albicans*, which were characterized by mass spectrometry, scanning electron microscopy, as well as atomic force microscopy demonstrating that the presence of Cm-p1 can interfere with nanofibers morphology. Furthermore, the release tests showed that Cm-p1 was almost completely released within the first hour. The MTS fibers biocompatibility and reactive oxygen species (ROS) generation by HUVEC cells were evaluated, showing that nanofibers containing peptide did not affect cell viability. Only 10% of the fibers containing Cm-p1 increased ROS generation and secretion of cytokines such as IL6 and TNF α . The use of bionanotechnology enables the production and incorporation of antimicrobial peptides into controlled release systems that may be used in the treatment of nosocomial infections.

Keywords: Pg-AMP1, heterologous expression, *Escherichia coli*, *Nicotiana benthamiana*, controlled delivery systems, Cm-p1, nanofibers

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFECÇÕES RELACIONADAS AOS SERVIÇOS DE SAÚDE (IRAS)

Desde o início das civilizações, as doenças infecciosas afetam a humanidade que desconheciam a existência e patogenicidade da maioria dos microrganismos. Posteriormente, no início do século XX, a descoberta e identificação da penicilina como agente antimicrobiano de possível uso terapêutico e a sua comercialização em 1942, vieram acompanhados da grande esperança de que em pouco tempo haveria disponíveis comercialmente medicamentos para combater a maioria das infecções (Lowy, 2003; Alanis, 2005). Desde então, outras moléculas têm sido desenvolvidas a partir do molde da penicilina, originando vários fármacos, de diferentes classes, mais eficientes e com menor possibilidade de causar efeitos adversos aos pacientes (Kong *et al.*, 2010). Entretanto, juntamente com a utilização de agentes quimioterápicos, surge também a resistência bacteriana (Fischbach e Walsh, 2010). A preocupação advinda desse fato é principalmente devido aos pacientes imunodeprimidos que frequentam os ambientes hospitalares e são susceptíveis às Infecções Relacionadas aos Serviços de Saúde (IRaS), causadas por bactérias multi-resistentes (Nascimento *et al.*, 2000). As IRaS, também conhecidas como infecções hospitalares ou nosocomiais, podem ser consideradas o principal evento adverso durante a internação de pacientes em tratamento médico ou cirúrgico. As IRaS também representam uma das maiores causas de morte e de aumento da morbidade em pacientes hospitalizados, e o risco de adquiri-las tem sido considerado universal pela *World Health Organization* (2011). Segundo estudos, entre 5 e 10 % dos países desenvolvidos podem ser acometidos por IRaS, enquanto esse número pode chegar a ser 20 vezes maior em países em desenvolvimento (Pittet *et al.*, 2008; Matlow e Morris, 2009). Em unidades de terapia intensiva estas infecções são consideradas ainda mais graves devido à alta incidência de pneumonia associada à ventilação mecânica, bem como infecções do trato urinário (Olaechea *et al.*, 2010).

O custo estimado de infecções adquiridas em hospitais nos Estados Unidos em 2002 está na ordem de 1,7 milhões de dólares, ocorrendo em 4,5 % das admissões, sendo considerada a sexta maior causa de morte (Kung *et al.*, 2008). As bactérias Gram-negativas são responsáveis por mais de 30 % das infecções hospitalares segundo dados do *U.S. National Healthcare Safety Network*. Dentre essas, 47 % das infecções adquiridas são casos de ventilação das vias aéreas associadas à pneumonia, e 45 % a infecções do trato urinário

(Hidron *et al.*, 2008; Olaechea *et al.*, 2010). Em unidades de terapia intensiva, os casos de infecções hospitalares com bactérias Gram-negativas sobem para 70 % (Gaynes e Edwards, 2005), sendo a família das *Enterobacteriaceae* o grupo mais identificado. A infecção pulmonar, causada principalmente por *Klebsiella* sp., *Escherichia coli* e *Enterobacter* sp. pode levar a óbito entre 13 a 55 % dos casos de pneumonia em crianças, idosos e adultos imunodeprimidos (Levy, 2004; Levy e Marshall, 2004). De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* dos Estados Unidos da América, estima-se que as IRaS representam cerca de 1,7 milhões dentre as infecções e resultam em 99.000 mortes associadas a cada ano no país (Klevens *et al.*, 2007; Scott II, 2009). Destas infecções, 32% referem-se às infecções do trato urinário, 22% são infecções de sítio cirúrgico, 15% são relativas à pneumonia (infecção pulmonar) e 14% são infecções na corrente sanguínea (Klevens *et al.*, 2007; Scott II, 2009).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, a taxa média de infecção hospitalar é de 15%, onde 3-15% dos pacientes infectam-se após procedimentos invasivos ou terapia imunossupressora (APECIH, 2005; ANVISA, 2007.). De forma geral, bactérias, fungos e vírus podem causar IRaS. Os fungos estão geralmente associados com aproximadamente 9%, os vírus 22% e as bactérias, os patógenos em destaque no ranking dessas infecções, com 69% dos casos de IRaS diagnosticadas (Aujard *et al.*, 2000; Levy, 2004; Levy e Marshall, 2004). Os microrganismos que aparecem mais comumente associados às IRaS estão demonstrados na Tabela 1 (Levy, 2004).

Tabela 1. Microrganismos mais frequentes nas IRaS.

Microrganismos	Sítios comuns de isolamento
Bactérias Gram-negativas	
<i>Escherichia coli</i>	Trato urinário, feridas cirúrgicas, sangue
<i>Pseudomonas sp.</i>	Trato urinário, trato respiratório
<i>Klebsiella sp.</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas
<i>Proteus sp.</i>	Trato urinário, feridas cirúrgicas
<i>Enterobacter sp.</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas
<i>Serratia sp.</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas
Bactérias Gram-positivas	
<i>Streptococcus sp.</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pele, feridas cirúrgicas, sangue
<i>Staphylococcus epidermitis</i>	Pele, feridas cirúrgicas, sangue
Fungos	
<i>Candida albicans</i>	Trato urinário, sangue
Outros	Trato urinário, trato respiratório, sangue

Fonte: Adaptado de Levy (2004).

Scott (2009) desenvolveu um estudo sobre o impacto econômico das IRaS nos Estados Unidos. O autor encontrou que o custo dessas infecções para cada paciente foi de US\$ 25.903 dólares no ano de 2007, enquanto o custo total das infecções no país foi de US\$ 45 bilhões de dólares no mesmo período. Portanto, levando-se em consideração os índices alarmantes de IRaS pelo mundo e o impacto econômico e social desse agravo, torna-se fundamental a busca por novos antimicrobianos além de medidas capazes de aprimorar os cuidados em saúde para a população com o objetivo de se evitar o aparecimento e disseminação dessas infecções.

Vários fatores como o alto custo e o tempo demasiado longo para o desenvolvimento de novos fármacos, aliados à grande complexidade de delineamento dos ensaios clínicos contribuem para a queda no descobrimento de novos antibióticos, além de reduzirem a longevidade do fármaco devido ao desenvolvimento da resistência (Peleg e Hooper, 2010). Williams e Bax (2009) ainda destacam a mudança de interesse das indústrias farmacêuticas para o desenvolvimento de fármacos mais lucrativos. Com a queda na descoberta de novos antibióticos e na disponibilidade de novas classes de antimicrobianos, agravados pelo uso indiscriminado desses medicamentos, cada vez mais existem microrganismos desenvolvendo resistência, sendo que algumas infecções estão se tornando quase impossíveis de serem

combatidas (Cohen, 1992; Alanis, 2005), culminando em um grave problema de saúde pública.

1.1.1 Infecções fúngicas causadas por *Candida* sp.

As espécies de fungos patogênicos pertencentes ao gênero *Candida* são citadas como aquelas que mais acometem humanos, sendo responsáveis pela colonização de mucosas oral, vaginal e gastrintestinal, podendo ocasionar doenças sistêmicas graves. As infecções nas mucosas são comuns não só em pacientes imunocomprometidos, mas também em pacientes saudáveis. A candidíase oral é uma das formas clínicas mais frequentes de candidíase mucocutânea e ocorre em todas as idades, com sintomas agressivos especialmente em crianças e idosos (Lopez-Martinez, 2010). É também a manifestação mais comum em pacientes infectados por HIV, presente em 50% dos pacientes HIV soro positivos e 90% dos pacientes com AIDS (Palmer *et al.*, 1996). Com aproximadamente 4 milhões de casos de HIV/ano, isso equivale a 2 milhões de casos de candidíase oral por ano. Espécies de *Candida* também causam doenças da mucosa em pessoas idosas e indivíduos desdentados, tais como a *Candida* associada à estomatite protética (Moyes e Naglik, 2011).

A candidíase sistêmica é reconhecida como a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos, sendo atribuídos a estes uma taxa superior a 40% e 20%, respectivamente (Dimopoulos *et al.*, 2007). Dentre os fatores de risco associados às infecções sistêmicas por *Candida* estão o baixo peso ao nascer, prematuridade, deficiência imunológica, doenças congênitas, hemodiálise, uso prolongado de antibióticos, procedimentos de rotina invasivos, utilização de cateteres vasculares e ventilação mecânica (Saiman *et al.*, 2000; Manzoni *et al.*, 2007). A nutrição parenteral, a pancreatite e o uso de esteróides ou imunossupressores também são fatores de risco (Mean *et al.*, 2008), assim como o aumento do tempo de permanência em ambientes hospitalares (Moran *et al.*, 2010; Kett *et al.*, 2011).

As infecções fúngicas sistêmicas apresentam maior gravidade em pacientes com doenças hematológicas, aumentando a taxa de mortalidade, variando entre 35% e 67%, especialmente em pacientes nas unidades de terapia intensiva (UTI) (Marriott *et al.*, 2009). Nesse ambiente hospitalar, em especial, as infecções fúngicas sistêmicas têm como causas frequentes os fungos dos gêneros *Candida* e *Aspergillus* spp, sendo a incidência do primeiro de sete a 15 vezes maior do que o segundo (Pfaller e Diekema, 2007). A taxa de mortalidade associada à candidemia nos EUA foi estimada em 49% podendo chegar a 75% em unidades de tratamento intensivo neonatal (Asmundsdottir *et al.*, 2008).

As doenças fúngicas têm-se apresentado com importantes patologias em pacientes imunossuprimidos, com relatos do aumento na sua incidência nas últimas três décadas (Moyes e Naglik, 2011). Em um levantamento epidemiológico realizado nos Estados Unidos (EUA) sobre a incidência dos casos de sepse revelou que as infecções fúngicas aumentaram 3 vezes no período compreendido entre os anos de 1979 e 2000 (Martin *et al.*, 2003), sendo que o maior período de hospitalização destacou-se como importante fator de risco no aumento da morbidade e da mortalidade entre os pacientes estudados (Kuzucu *et al.*, 2008; Moyes e Naglik, 2011).

Outro estudo aponta que dentre as infecções hospitalares, aquelas causada por fungos do gênero *Candida* foram considerados o quarto lugar quando comparado com outros gêneros de microrganismos envolvidos em infecções nosocomiais nos EUA (Wisplinghoff *et al.*, 2004; Lopez-Martinez, 2010), juntamente com bactérias de relevância como *Enterococcus* (*Escherichia coli*) e *Pseudomonas* spp. (Wisplinghoff *et al.*, 2004). Na Europa, é a sexta das 10 causas de infecções hospitalares sistêmicas (Marchetti e Bille, 2004).

Durante as últimas décadas, vários países ao redor do mundo testemunharam uma mudança na epidemiologia de infecções por *Candida*, caracterizada por uma mudança progressiva de uma predominância de *Candida albicans* para uma predominância de não-*albicans* (Kuzucu *et al.*, 2008; Mean *et al.*, 2008). Entre as espécies não-*albicans* mais recorrentes, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata* se destacam. Na década de 1980, *C. albicans* costumava ser o patógeno mais freqüente em casos de infecções hospitalares sistêmicas, e desde os anos de 1990 tornou-se a quarta causa de infecções hospitalares (Perlroth *et al.*, 2007). Em contrapartida, *C. glabrata* aumentou progressivamente e pode ser atualmente responsável por 15% a 20% das infecções na maioria dos países (Pfaller *et al.*, 2007), considerado o segundo patógeno mais isolado nos EUA (Horn *et al.*, 2007).

Esses dados corroboram parcialmente com o que se observa em estudos realizados no Brasil, nos quais se destaca a importância de candidemias em hospitais (Godoy *et al.*, 2003; Colombo *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2010). Em um estudo conduzido em um hospital brasileiro durante 10 anos (1998 a 2007) pode-se observar na avaliação de candidemias que 44% destas foram causadas por *C. albicans*, e *C. parapsilosis* foi o segundo agente mais comum (37%). As espécies *C. tropicalis* (13%), *C. glabrata* (5%) e *C. krusei* (1%) apresentaram baixa incidência. Porém, a maior taxa de mortalidade foi observada em pacientes infectados por *C. glabrata* (80%), e a nutrição parenteral foi estritamente relacionada à infecção por esta espécie de *Candida* (Bonfietti *et al.*, 2012).

Considerando a espécie *C. parapsilosis*, um estudo realizado na Espanha relatou que esta é provavelmente a espécie que teve o maior aumento de incidência desde 1990, tornando-se o agente predominante de candidemia em determinados centros (Rodriguez *et al.*, 2006; Asadzadeh *et al.*, 2008). No Brasil, há poucos dados avaliando exclusivamente a epidemiologia de candidíase por *C parapsilosis* (Brito *et al.*, 2006). Em um estudo realizado em São Paulo, durante 7 anos (desde 2002 a 2008), a taxa de mortalidade associada a presença deste patógeno foi 45% maior do que descrito para países europeus e para os EUA (Miranda *et al.*, 2012).

Nos EUA, os custos anuais estimados para infecções fúngicas sistêmicas são de \$2,6 bilhões, dos quais \$1,8 bilhão é destinado ao tratamento das infecções causadas por fungos do gênero *Candida*, com custos semelhantes na Europa (Wilson *et al.*, 2002). Os dados denotam a relevância das candidemias na saúde pública, demonstrando o desafio sócio-econômico para comunidades em todo o mundo.

As mudanças epidemiológicas nas infecções por *Candida* em diferentes regiões geográficas sugerem um importante papel da diminuição da sensibilidade a agentes antifúngicos comumente utilizados (Mean *et al.*, 2008). Mesmo com o desenvolvimento de muitas drogas antifúngicas, como os polienos e triazóis, os índices de mortalidade devido a infecções fúngicas sistêmicas ainda são altos. A resistência a antimicrobianos já foi observada em alguns países da América do Norte e na Europa (Sobel, 2006), justificando a importância do estudo de novas drogas e de novos modelos de ação na busca de um composto que reduza ou impeça o desenvolvimento de patógenos oportunistas resistentes como os do gênero *Candida*.

1.2 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Um crescente interesse no estudo de peptídeos naturais com atividades antibióticas surgiu com o advento dos microrganismos resistentes aos antimicrobianos convencionais. Estes peptídeos, denominados peptídeos antimicrobianos (PAMs), consistem em uma parte importante do sistema imune inato, sendo que a sua produção compreende alguns dos mecanismos de defesa do hospedeiro durante as etapas iniciais do processo de infecção (Hancock e Scott, 2000; Zasloff, 2002). Essas moléculas apresentam um amplo espectro de ação contra fungos e bactérias patogênicas, sendo extensivo aos vírus, parasitas e mesmo células cancerígenas (Li *et al.*, 2012; Mandal *et al.*, 2014b).

Os mecanismos de ação dos PAMs, apesar das diferenças existentes, estão envolvidos com a alteração da permeabilidade da membrana plasmática dos microrganismos. Esta capacidade de interagir com as membranas lipídicas está relacionada a diversas características dessas moléculas como as propriedades bioquímicas definidas pela sequência de aminoácidos (carga, estrutura anfipática e hidrofobicidade) e conformação tridimensional (geometria, ângulo polar e conformação molecular) (Ganz, 2003; Brogden, 2005). Li e colaboradores (2012) explicam que a carga positiva de peptídeos catiônicos pode ser responsável pela ação seletiva de membranas citoplasmáticas de microrganismos carregados negativamente e que os resíduos hidrofóbicos dessas moléculas têm a capacidade de interagir com os lipídios (Mangoni e Shai, 2009). A alteração da composição dos aminoácidos, anfipaticidade, cargas positivas e massa molecular podem afetar a atividade dos PAMs, que pode ser melhorada, além de permitir que a seletividade da molécula seja alterada para membranas bacterianas ou fúngicas através da amalgamação dos aminoácidos carregados positivamente ou negativamente (Mandal *et al.*, 2014b). Interações entre ácidos nucleicos e proteínas fosforiladas também ocorrem devido à característica catiônica dos PAMs (Mangoni e Shai, 2009). Peptídeos sintéticos análogos aos AMPs naturais têm sido empregados com o objetivo de estudar as características estruturais dessas moléculas e contribuir para a melhoria na atividade dessas moléculas contra bactérias, fungos e alguns vírus (Jenssen *et al.*, 2006). Um estudo mostrou como a atividade antimicrobiana e a estrutura da lactoferrina bovina foi influenciada por cadeias laterais de aminoácidos específicos (Mandal *et al.*, 2014b).

No modelo clássico de interação dos PAMs com membranas celulares, aparentemente, pode ser necessária uma atração do peptídeo pela superfície da membrana microbiana por força eletrostática ou devido à presença de cargas residuais presentes na superfície do microrganismo. Após essa atração o peptídeo se insere na cápsula polissacarídica e finalmente alcança a membrana citoplasmática. A partir desta interação com os lipídios da bicamada, o peptídeo altera a organização e a permeabilidade da membrana fosfolipídica causando a despolarização e desequilíbrio osmótico celular através da sua interação (Brogden, 2005; Nguyen *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012,).

A presença de peptídeos também pode afetar a espessura da membrana que pode se remodelar formando domínios ricos em lipídios aniônicos em volta desses peptídeos. Outra possibilidade consiste na formação de intermediários “*non-bilayer*” a partir da interação dos peptídeos com a membrana. Essas moléculas também podem levar à oxidação dos fosfolipídios ou podem se ligar a pequenos ânions através da bicamada levando ao seu efluxo. O potencial de membrana pode ser alterado sem necessariamente levar a um sério dano na

bicamada, ou mesmo, segundo o modelo eletroporação molecular, o acúmulo do peptídeo aumenta o potencial de membrana o que induz a um estado transiente de permeabilidade da bicamada aos próprios peptídeos. Importante ressaltar que um mesmo peptídeo pode apresentar diferentes modos de ação (Nguyen *et al.*, 2011). Na Figura 1 estão ilustrados os modelos de interação entre os PAMs e a membrana celular.

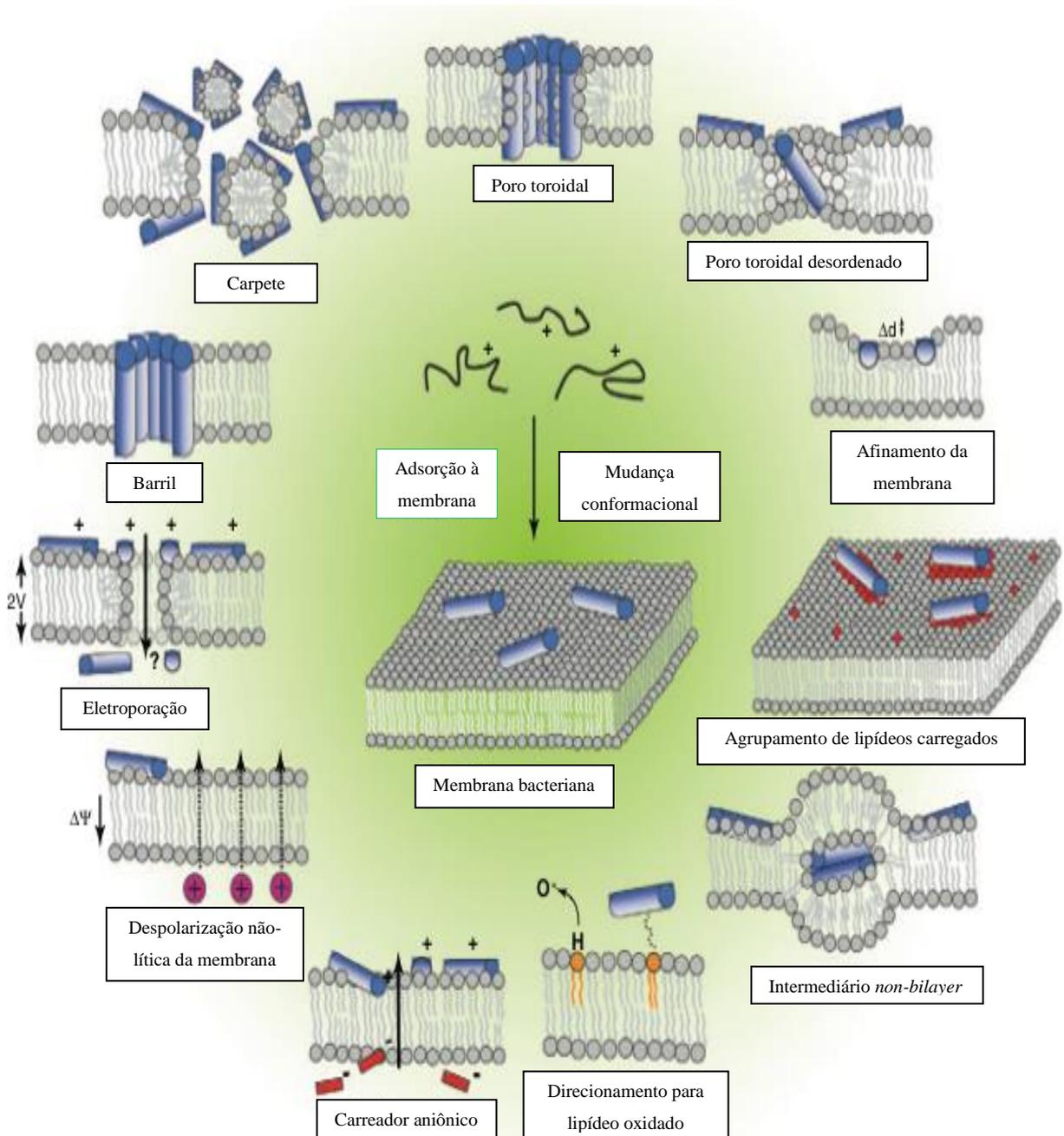


Figura 1: Modos de interação dos PAMs com as membranas celulares. Adaptado de Nguyen *et al.*, 2011.

Entretanto, outros estudos têm relatado a capacidade dos PAMs em afetar a viabilidade dos microrganismos a partir da interação com alvos intracelulares como inibição da síntese protéica e do DNA, interferência no dobramento protéico pela inibição de chaperonas, inibição da atividade enzimática e da síntese da parede celular (Nicolas, 2009; Nguyen *et al.*, 2011).

O principal componente da parede celular de organismos procariotos são os peptídeoglicanos, que estão organizados em múltiplas camadas intercalados pelos ácidos teicoico e lipoteicoico. Estas moléculas consistem em um importante alvo para novos agentes terapêuticos no tratamento de infecções por não estarem presente em células eucarióticas (Yount e Yeaman, 2013). Como exemplo, no caso dos lantibióticos, que empregam um precursor da síntese de peptídeoglicanos, o lipídeo II, como alvo para compostos antibacterianos (Islam *et al.*, 2012). O peptídeo antimicrobiano nisina, um lantibiótico do tipo A(I), apresenta afinidade pelo lipídeo II. Estudos sobre interação entre a nisina e membranas revelaram que este peptídeo forma poros em membranas através de alguns passos que incluem a sua ligação e inserção, sendo já demonstrado que os poros formados por esta molécula em membranas contendo o lipídeo II são estáveis (Islam *et al.*, 2012). Primeiramente, ocorre uma atração eletrostática entre a nisina e os grupos fosfolipídicos da bicamada lipídica, para posteriormente ocorrer a sua ligação aos grupos fosfato do lipídeo II. Os resíduos hidrofóbicos da região N-terminal do peptídeo são responsáveis pela sua inserção na membrana, seguindo-se pela agregação dos monômeros do peptídeo para a formação do poro (Islam *et al.*, 2012), e consequente efluxo de aminoácidos, K^+ , e ATP pela célula (Yount e Yeaman, 2013). Nisina também pode interferir na síntese dos ácidos teicoico e lipoteicoico a partir da sua ligação com as moléculas lipídeo III e IV (Müller *et al.*, 2012) além de estimular a atividade da autolisina, resultando em danos na parede celular com subsequente lise e morte celular. Outros peptídeos antimicrobianos também podem inibir a síntese de peptídeoglicanos como, por exemplo, a mersacidina. Entretanto, diferentemente da nisina, este peptídeo provavelmente liga-se aos resíduos de açúcar do lipídeo II (Islam *et al.*, 2012). Os peptídeos lacticina 3147, estafilococina C55, plantaricina W e haloduracina são lantibióticos que agem sinergicamente otimizando a atividade antimicrobiana; enquanto um liga-se ao lipídeo II, o outro forma poros transmembrana (Guilhelmelli *et al.*, 2013). Além dos lantibióticos, a bacteriocina Lcn972 atua na síntese da parede celular ligando-se ao lipídeo II (Yount e Yeaman, 2013).

Para inibir a síntese proteica e do DNA, os peptídeos precisam atravessar a parede e membrana celular e então ligarem-se aos seus alvos intramoleculares como proteínas, RNA e

DNA. O peptídeo antimicrobiano buforina II possui em sua estrutura uma prolina na posição 11 a qual desempenha um papel importante na penetração do peptídeo para dentro da célula (Cho *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2011). No citoplasma, o peptídeo liga-se ao DNA e RNA, possivelmente devido à identidade da sequência da molécula do peptídeo e a região N-terminal da histona H2A (Cho *et al.*, 2009). Já a indolicidina pode promover a despolarização da membrana inibindo, assim a síntese de DNA (Nan *et al.*, 2009). Alguns peptídeos inibem os processos de transcrição e tradução, como é o caso da indolicidina e puroindolina. Apesar desse processo não estar devidamente elucidado, é possível que as cargas positivas desses peptídeos interajam com os grupamentos fosfato dos ácidos nucleicos (Park *et al.*, 1998, Uytterhoeven *et al.*, 2008). As catelicidinas (Kaneider *et al.*, 2007), bacterenecinas (Skerlavaj *et al.*, 1990) e microcinas (Nocek *et al.*, 2012; Rebuffat, 2012), são exemplos de classes de peptídeos antimicrobianos que podem inibir a síntese de proteínas e do DNA. Estas famílias de peptídeos possuem representantes capazes de bloquear a síntese proteica e de DNA em bactérias, aumentar a permeabilidade da membrana, inibir a síntese de RNA e estabilizar o complexo intermediário girase-DNA, o que pode desencadear uma série de reações levando à morte celular (Skerlavaj *et al.*, 1990; Kaneider *et al.*, 2007; Nocek *et al.*, 2012; Rebuffat, 2012; Collin *et al.*, 2013).

Relatos de peptídeos com atividade antitumoral descrevem a sua capacidade de induzir apoptose em células tumorais através do aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio e caspase-3 (Cruz-Chamorro *et al.*, 2006). Outros peptídeos já induzem a apoptose a partir da modificação da concentração intracelular do potássio, sem ativação da caspase (Zhang *et al.*, 2006a); e da externalização da fosfatidilserina e ativação da caspase, sem alterar a permeabilidade da membrana celular (Paredes-Gamero *et al.*, 2012). Também há moléculas que podem causar apoptose e necrose induzidas (Soletti *et al.*, 2010; Paredes-Gamero *et al.*, 2012; Mulder *et al.*, 2013).

Apesar da vasta literatura disponível sobre PAMs ainda há um longo caminho a ser percorrido até que estas moléculas estejam disponíveis comercialmente. Esforços têm sido conduzidos com o objetivo de trazer os PAMs a um novo estágio de desenvolvimento contornando os obstáculos existentes como, por exemplo, o alto custo de produção, susceptibilidade a proteólise, sensibilidade e respostas alérgicas e o não conhecimento da toxicidade após administrações sistemáticas dos peptídeos (Cândido *et al.*, 2014). O alto custo dos ensaios clínicos, juntamente com a dependência de recursos financeiros federais e parceiros privados também têm contribuído para que poucos peptídeos estejam em testes

clínicos (Fox, 2013). Na Tabela 2 estão listados alguns peptídeos antimicrobianos em fase clínica de estudos.

Tabela 2. Peptídeos antimicrobianos em fase clínica de desenvolvimento.

Peptídeo	Origem	Indicação	Fase de desenvolvimento
Maganina	Pele do anfíbio <i>Xenopus laevis</i>	Ferida em pé diabético	3
Omiganan	Sintético	Rosácea	2
OP-145	Sintético	Infecção crônica bacteriana no ouvido médio	2
Novexatina		Infecção fúngica	½
Lytixar (LTX-109)	Sintético	MRSA	½
NVB302	Lantibiótico	<i>C. difficile</i>	1
MU1140	Lantibiótico	Bactérias Gram-positivas (MRSA, <i>C. difficile</i>)	Pré-clínica
Arenicina		Bactérias Gram-positivas resistentes	Pré-clínica
Avidocina e purocina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Saúde humana e segurança alimentar	Pré-clínica
IMX924	Sintético	Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas	Pré-clínica

Fonte: adaptado de Fox, 2013.

Autoridades nos Estados Unidos e Europa têm trabalhado para facilitar o desenvolvimento de novos antimicrobianos e incorporar metodologias inovadoras de testes clínicos e avaliação da efetividade clínica. Na Europa, o estabelecimento de novos critérios clínicos para avaliação de antibióticos e a permissão de pacientes que já fizeram o uso de outros antimicrobianos anteriormente participem de testes clínicos, tem sido estabelecido em novos guias pela European Medicines Agency. Nos Estados Unidos, foi organizada a *Antibacterial Drug Development task Force* pelo *Food and Drug Administration* (Fox, 2013). Formulações, modificações nas moléculas dos peptídeos e sistemas de liberação controlada de fármacos têm sido empregados com o objetivo de superar problemas de biodisponibilidade e farmacocinética (Cole *et al.*, 2003; Gordon *et al.*, 2005; Devocelle, 2012; Haney *et al.*, 2012; Mandal *et al.*, 2014a).

O aprofundamento de pesquisas em relação à toxicidade dos PAMs contra células humanas, mecanismos de ação e estudos de estrutura e função devem ser conduzidos com o objetivo de levar estas moléculas a um novo estágio de desenvolvimento clínico.

1.3 EXPRESSÃO HETERÓLOGA

Peptídeos encontram-se naturalmente presentes em concentrações muito reduzidas nos organismos (Christensen *et al.*, 2007). Para a sua utilização farmacêutica ou para abordagens biológicas como estudos do mecanismo de ação e relação estrutura-função faz-se necessária uma quantidade razoável de moléculas puras e ativas. Dessa forma, esses compostos precisam ser produzidos em grandes quantidades. Diferentes métodos estão descritos na literatura para a produção de PAMs, como o isolamento direto do organismo o qual produz o peptídeo de interesse, síntese química ou expressão via sistemas heterólogos (Ingham e Moore, 2007). Entretanto, o isolamento de peptídeos direto da fonte natural trata-se de um mecanismo que aparentemente não tem sido economicamente sustentável, além de exigir muito tempo até que se adquira uma quantidade razoável (Zhou *et al.*, 2009). A problemática que surge com a síntese química de peptídeos esbarra na questão econômica. Essa técnica permite a produção de peptídeos naturais e sintéticos, porém apresenta altos custos para síntese de sequências com mais de dez resíduos de aminoácidos, e ainda, esses custos podem ser consideravelmente elevados na síntese de sequências que apresentam pontes de sulfeto, o que dificulta a produção dessas moléculas (Li, 2009).

O avanço da tecnologia do DNA recombinante possibilitou expressar os PAMs em maiores quantidades para usos diversos (Li e Chen, 2008). Uma vez que essas técnicas possibilitam a clonagem de genes exógenos codificadores de proteínas em vetores específicos para expressão em células hospedeiras procarióticas e eucarióticas (Park *et al.*, 2008; Zelena *et al.*, 2009), facilitando a produção dessas moléculas em grande escala, sendo a *E. coli* considerada o método mais eficiente em relação a tempo e custo (Li, 2011a). A produção desses peptídeos por técnicas biotecnológicas pode ampliar seu uso em diferentes setores, além dos conhecimentos a cerca de seu modo de ação sobre os organismos patogênicos.

Diferentes estratégias têm sido desenvolvidas para a produção de peptídeos antimicrobianos originados de plantas em sistemas procarióticos (*Escherichia coli*) e eucariotos (leveduras, plantas e células animais) (Oard e Enright, 2006; Stotz *et al.*, 2009). Dentre os sistemas descritos na literatura, as bactérias e as leveduras representam 95% dos

sistemas de expressão heteróloga de peptídeos (Ingham e Moore, 2007; Li e Chen, 2008; Li, 2009).

1.3.1 Expressão heteróloga em *E. coli*

De um modo geral, a bactéria mais utilizada para expressar PAMs derivados de diversos organismos, tais como plantas, insetos, peixes, mamíferos, humanos tem sido a *E. coli*, devido à facilidade de manipulação genética, baixo custo de produção em relação ao meio de cultura, disponibilidade de uma vasta diversidade de vetores de expressão, controle da expressão gênica devido ao amplo conhecimento sobre a genética e fisiologia deste organismo e rapidez, normalmente produzindo proteína em grandes quantidades em um único dia (Rao *et al.*, 2005; Sorensen e Mortensen, 2005; Li, 2011a; Parachin *et al.*, 2012).

Entretanto, alguns peptídeos antimicrobianos de plantas mostraram claras dificuldades em serem expressos em bactérias pelas próprias características específicas de cada peptídeo que, após expressos, podem ser proteoliticamente degradados e/ou em algumas vezes são insolúveis e tóxicos para a célula hospedeira, (Pazgier e Lubkowski, 2006; Parachin *et al.*, 2012).

Classes de peptídeos, como as defensinas de plantas, apresentam um desafio para expressão heteróloga utilizando sistemas procarióticos devido às características estruturais que determinam as propriedades biológicas dessas proteínas. O alto conteúdo de cisteínas e argininas também podem afetar os níveis de expressão, bem como o rendimento de recuperação (Cabral *et al.*, 2003). A formação de pontes dissulfeto em *E. coli* é dificultada devido ao estado reduzido em que o citoplasma da célula é mantido, impedindo a formação dessas ligações pelos sistemas enzimáticos tireodoxina e glutaredoxina/glutathione. Para tanto, essas moléculas devem ser exportadas para o periplasma onde a formação de pontes dissulfeto é catalisada pelo sistema Dsb. Apesar de poucos estudos reportarem a capacidade da *E. coli* realizar modificações pós-traducionais como glicosilação e acetilação, condições específicas como mutações no *locus pgl*, para N-glicosilação, ou a co-expressão de membros do complexo *Nat*, para acetilação podem ser requeridas, (Pelegri *et al.*, 2009; Alvarez *et al.*, 2010; Makino *et al.*, 2011), o que não se aplica ao Pg-AMP1 já que o mesmo não apresenta nenhuma modificação pós-traducional.

Outro problema de expressão em bactérias consiste no acúmulo de proteínas-alvo em agregados insolúveis conhecidos como corpos de inclusão. Estes consistem geralmente em proteínas agregadas, quase puras, que são tipicamente deformadas durante a sua formação e,

portanto, biologicamente inativas (Villaverde e Carrio, 2003; Cunningham e Deber, 2007; Zou *et al.*, 2011). Diferentes abordagens podem ser utilizadas para solubilizar corpos de inclusão. Estes procedimentos envolvem o *refolding* da proteína heteróloga e diversas condições, como expressão da proteína em temperaturas reduzidas, a utilização de cepas especiais derivadas da linhagem BL21 (DE3) de *E. coli* e a expressão de proteínas sob temperaturas reduzidas utilizando o promotor *cspA* (Kovalskaya e Hammond, 2009). Um exemplo consiste na expressão da defensina PTH1 e a proteína rica em cisteína SN1 em *E. coli* que possuem atividade contra bactérias e fungos fitopatogênicos. O vetor pET26b+ foi escolhido por conter a sequência *pelB* localizada na porção N-terminal, já que este peptídeo sinal direciona a expressão para o periplasma e reduz ou elimina a formação de corpos de inclusão. A indução da cultura a 25°C e o uso da linhagem BL21 (DE3) também foram realizados visando expressar as proteínas em sua forma solúvel, sem sucesso. Os IBs foram solubilizados em uréia 8M e o *refolding* foi conduzido para os ensaios de purificação e de atividade antibacteriana e antifúngica (Kovalskaya e Hammond, 2009). As α -defensinas hNP-1 to hNP-3, and hD-5 and hD-6 também foram expressas na forma de corpos de inclusão em *E. coli* (Pazgier e Lubkowski, 2006).

Outra abordagem nos sistemas de expressão biológica tem sido desenvolvida através da fusão do peptídeo antimicrobiano a proteínas conjugadas, também conhecidas por *tags* ou proteínas de fusão (Rao *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2007). A presença de um segmento aniônico capaz de neutralizar a carga positiva de peptídeos antibacterianos permite um aumento nos níveis de expressão e na solubilidade dos peptídeos recombinantes. As proteínas de fusão mais utilizadas incluem glutationa-S-transferase (GST), *maltose-binding protein* (MBP), tioredoxina (Trx), ubiquitina (Rao *et al.*, 2004; Peti e Page, 2007; Xu *et al.*, 2007) e chaperonas (Hartl e Hayer-Hartl, 2002; Sorensen e Mortensen, 2005). Além disto, o uso de proteína de fusão pode melhorar significativamente a estabilidade das proteínas-alvo em células hospedeiras (Rao *et al.*, 2005). Um estudo avaliou a expressão da viscotoxina recombinante usando 13 proteínas de fusão diferentes em *E. coli* com o objetivo de verificar qual proteína de fusão possibilitaria gerar maior quantidade da proteína em sua forma solúvel. Viscotoxinas pertencem à família das tioninas e são tóxicas a fungos fitopatogênicos. Dentre as proteínas de fusão empregadas, a tioredoxina foi a que alcançou maior quantidade de viscotoxina solúvel (Bogomolovas *et al.*, 2009). Outro estudo demonstrou o aumento de solubilidade de agregados fibrilares como TEL-SAM e Ab42 em *E. coli* após a sua fusão com as proteínas de fusão hiper-ácidas Msb, Yd, e Od (Zou *et al.*, 2011).

1.3.2 Expressão transiente em *Nicotiana benthamiana*

O uso de plantas para a expressão heteróloga e estudos de PAMs compreende uma abordagem que pode oferecer uma solução para a criação de culturas resistentes a uma ampla gama de patógenos (Oard e Enright, 2006; Cândido *et al.*, 2011; Viana *et al.*, 2012). Estudos recentes mostram que o uso de plantas para a produção de proteínas recombinantes oferece vantagens consideráveis sobre as bactérias e outros sistemas convencionais, como a cultura de células de mamíferos e fermentação de leveduras. A principal vantagem de plantas como sistema de produção consiste na disponibilidade de biomassa que pode ser obtida pelo uso da infraestrutura já existente de plantio, colheita, armazenamento e processamento de culturas, visto que as plantas funcionam como biofábricas produzindo grandes quantidades de proteínas (Cândido *et al.*, 2011; Viana *et al.*, 2012). Outra vantagem reside no fato da proteína recombinante produzida em plantas poder executar a maioria das modificações pós-traducionais necessárias para a estabilidade da proteína, bioatividade, além de farmacocinética favorável (Lima-Filho *et al.*, 2010). A adição da sequência de peptídeos sinais aos vetores de expressão em plantas permite a expressão da molécula de interesse em compartimentos celulares como retículo endoplasmático, complexo de golgi e cloroplasto (Vitale e Denecke, 1999; Viana *et al.*, 2013). O retículo por possuir um ambiente oxidante, com baixa atividade proteolítica, contribui para o acúmulo da proteína recombinante. A presença de chaperonas no interior do retículo também colabora para o dobramento adequado da proteína ou peptídeo expressos. Modificações pós-traducionais como adição de grupos glicanos e formação de pontes dissulfeto podem ocorrer no interior do retículo e do complexo de golgi (Gomord e Faye, 2004; Bulaj, 2005; Viana *et al.*, 2013).

Uma lista considerável de plantas tem sido utilizada para transformação genética, expressão e purificação de PAMs incluindo a *Solanum tuberosum* (batata) (Gao *et al.*, 2000; Almasia *et al.*, 2008), *Nicotiana benthamiana* e *Nicotiana tabacum* (tabaco) (Franco *et al.*, 2006). Culturas de *Oryza Sativa* (arroz) (Iwai *et al.*, 2002; Imamura *et al.*, 2010; Jha e Chattoo, 2010) e cevada (Molina *et al.*, 1997) também têm sido utilizadas para a expressão dessas moléculas conferindo resistência dessas culturas a uma variedade de patógenos.

Dentre as limitações deste sistema está o baixo nível de expressão da proteína que requer uma grande quantidade de tecido vegetal. (Gao *et al.*, 2000, Degray *et al.*, 2001; Iwai *et al.*, 2002; Almasia *et al.*, 2008; Desai *et al.*, 2010). O alto custo e o grande tempo requerido também são barreiras para expressão neste tipo de sistema (Kovalskaya e Hammond, 2009), além da planta poder realizar modificações pós-traducionais incorretas. Isto pode ocorrer

porque proteínas produzidas por plantas apresentam os açúcares α -(1,3) fucose e β -(1,2) xilose, não encontrados em animais; em contrapartida, não apresentam resíduos terminais de galactose e ácido siálico, presentes em animais (Sethuraman e Stadheim, 2006; Desai *et al.*, 2010; Parachin *et al.*, 2012). Outra limitação são os altos custos de processamento e purificação que também aumentam conforme a complexidade do tecido no qual a proteína foi expressa. Entretanto, estes custos podem ser minimizados através do aumento da expressão (Streatfield, 2007; Conley *et al.*, 2011b).

Uma possível alternativa mais simples e rápida, atualmente, consiste na utilização da expressão transiente, baseada na transformação por *Agrobacterium* em plantas. Neste sistema, folhas são infiltradas com uma suspensão de *Agrobacterium*, a vácuo, sendo o produto detectável após 2-4 dias, por um período de 7-10 dias, após o qual o nível de expressão diminui, não sendo mais detectável (Gleba *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2005; Viana *et al.*, 2013). A expressão transiente possui vantagens sobre a expressão estável, por ser um método mais rápido e é usada, por exemplo, em casos os quais as plantas atuam como biofábricas por um período de tempo suficiente para a extração da proteína recombinante de interesse (Desai *et al.*, 2010; Viana *et al.*, 2013).

A expressão de proteínas heterólogas em plantas pode ser obtida através de vetores virais que têm a capacidade de iniciar rapidamente a expressão da proteína de interesse. Esses vetores, derivados de vírus de plantas, são manipulados geneticamente, *in vitro*, para introduzir sequências de interesse externas dentro do genoma viral (Pogue *et al.*, 2002). Outra vantagem consiste em que plantas infectadas por vetores virais levam à expressão sistêmica visto que a proteína recombinante é produzida em todas as células devido ao espalhamento do vírus por toda a planta (Desai *et al.*, 2010; Viana *et al.*, 2013).

A presença de relatos na literatura com inúmeras plantas expressando peptídeos antimicrobianos com atividade antifúngica e antibacteriana reforça a idéia do uso desta tecnologia para as mais diferentes aplicações. Entretanto, estes peptídeos têm sido empregados utilizando a transformação estável com o objetivo de causar resistência a culturas. O penaeidina4-1 (Pen4-1) consiste em um peptídeo antimicrobiano isolado do camarão com grande potencial por apresentar atividade contra fungos fitopatogênicos como *Botrytis cinera*, *Penicillium crustosum*, *Fusarium oxysporum* (Cuthbertson *et al.*, 2004) e contra as espécies de fungo multi-resistentes *Cryptococcus neoformans*, *Candida lipolytica*, *Candida inconspicua*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae* e *Candida glabrata* (Cuthbertson *et al.*, 2006). A partir do Pen4-1, Zhou e colaboradores (2011) desenvolveram linhagens transgênicas de grama (*Agrostis stolonifera* L.) com o aumento da resistência aos fungos

fitopatogênicos *Sclerotinia homoearpa* e *Rhizoctonia solani* como resultado da expressão do Pen4-1. Em outro estudo, o arroz foi modificado geneticamente com o objetivo de torná-lo resistente ao fungo fitopatogênico *Magnaporthe oryzae* cuja infecção leva a consideráveis perdas de rendimento e qualidade da safra (Imamura *et al.*, 2010). Para tanto, o peptídeo antimicrobiano thanatina produzido pelo inseto *Podisus maculiventris*, foi introduzido no arroz para criar a resistência esperada. Seguindo a mesma linha, a defensina Rs-AFP2 foi capaz de causar tolerância no arroz aos fungos fitopatogênicos *Magnaporthe oryzae* e *Rhizoctonia solani* após a transformação genética do arroz com este peptídeo antimicrobiano (Jha e Chattoo, 2010).

Assim, a partir do exposto, a expressão do peptídeo antimicrobiano Pg-AMP1 em *Nicotiana benthamiana* pode levar à produção e purificação de moléculas ativas, visto que a maioria dos relatos na literatura descreve o uso desse sistema de expressão com o objetivo de conferir resistência à cultura de vegetais.

1.4 NANOBIOTECNOLOGIA

A nanotecnologia consiste na ciência que estuda o desenvolvimento e a utilização de materiais, dispositivos e sistemas em escala nanométrica e vem mostrando impactos positivos na área da saúde através da sua aplicação na melhoria de testes diagnósticos e tratamento de doenças. Este segmento, denominado nanobiotecnologia, consiste principalmente em desenvolver sistemas carreadores de medicamentos e moléculas em escala nanométrica visando alcançar melhor estabilidade, absorção dos fármacos e controlar a liberação das drogas (Speiser, 1991; Zanetti-Ramos e Creczynski-Pasa, 2008; Lehner *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de estruturas nanométricas complexadas a moléculas terapêuticas tem mostrado um impacto significativo para terapêutica medicinal. Os produtos empregados se diferenciam em tamanho, forma, composição e propriedades físico-químicas podendo variar em área de superfície e a reatividade da molécula. Essas características irão promover uma melhora na solubilidade, no tempo de meia-vida da molécula, uma diminuição da toxicidade a partir da capacidade de direcionamento do fármaco para o sítio de ação específico e ainda permitir a aplicação por várias vias de administração (Pinto Reis *et al.*, 2006; Bawa, 2009; Zhang *et al.*, 2013b).

Segundo Dandagi e colaboradores (2006), encontram-se disponíveis diversos tipos de materiais para serem empregados na preparação dos sistemas nanométricos, que juntamente

com a seleção da técnica empregada na síntese, proporcionam a obtenção de variados modelos de estruturas. A escolha do material a ser empregado na formulação dependerá da finalidade a qual o sistema será empregado. Diversas metodologias têm sido descritas com o objetivo de melhorar os mecanismos de liberação dos fármacos e mesmo suas propriedades mecânicas (Hoffman, 2002). Uma das propostas descritas na literatura utiliza polímeros naturais à base de polissacarídeos no desenvolvimento de novos sistemas de liberação visando aprimorar a biocompatibilidade e biodegradabilidade do princípio ativo (Berger *et al.*, 2004). Imura e colaboradores (2003) destacam a semelhança dos constituintes das membranas celulares com as vesículas lipossomais fosfolipídicas. Estes compostos também podem ser utilizados para proteger compostos químicos de atividade farmacológica e mesmo encapsular moléculas de alto peso molecular (Teixeira *et al.*, 2008).

Os polímeros biodegradáveis podem possibilitar a liberação de um princípio ativo de forma lenta e gradual por meio do controle de suas propriedades e o controle de sua velocidade de degradação, sendo amplamente empregados em sistemas de liberação sustentada (Jain, 2000). O uso desses polímeros permite a incorporação de moléculas orgânicas de alto peso molecular, contendo, normalmente, mais de cinquenta monômeros, que formam uma matriz ou reservatório onde o fármaco estará inserido. Durante a biodegradação desse sistema, o princípio ativo pode ser liberado de acordo com uma cinética previamente definida no momento da síntese do complexo fármaco-polímero e desencadeada em condições conhecidas como a ação enzimática, mecânica e alterações de pH (Commandeur *et al.*, 2006). Abreu (2008) enumera em seu trabalho vários parâmetros que podem ser controlados na formulação desses sistemas e podem ser responsáveis pelo controle e extensão da resposta do princípio ativo. Os mais importantes são: pH, campo elétrico, temperatura e tipo de solvente utilizado (Abreu, 2008).

Em meio aos inúmeros polímeros estudados, encontram-se comercialmente disponíveis exemplos de polímeros biodegradáveis naturais, como a quitosana e o alginato, e polímeros biodegradáveis sintéticos, como os co-polímeros dos ácidos láctico e glicólico (PLGA). Devido à sua versatilidade de manipulação, a combinação dos dímeros cíclicos dos ácidos láctico e glicólico com princípios ativos para fins terapêuticos pode ser feita em quantidades suficientes para a administração de uma ou mais doses (Duncan, 2006). Dentre os polímeros naturais, destaca-se a quitosana, um polissacarídeo catiônico em meio ácido, não tóxico, com alta capacidade de adsorção e biocompatibilidade (Doll *et al.*, 2013). Polímeros sintéticos também têm sido utilizados para aplicações farmacêuticas e biomédicas. Como exemplo, Abreu (2008) cita o poliuretano, o ácido poliacrílico, o poliácridonitrila e a

poliacrilamida. A associação de outros polímeros com a quitosana, como, por exemplo, o alginato e a pectina vêm sendo testada (De e Robinson, 2003). Estes complexos vêm sendo muito utilizados para encapsular proteínas, melhorando a sua biodisponibilidade (Ruel-Gariepy e Leroux, 2004).

1.4.1 Antimicrobianos em sistemas de liberação controlada

O uso de peptídeos antimicrobianos em aplicações clínicas é dificultado devido à sua rápida degradação proteolítica no trato gastrointestinal e na corrente sanguínea, diminuindo o seu tempo de meia-vida e limitando a sua administração pela via parenteral e oral. O transporte dessas moléculas através das barreiras biológicas também consiste em um obstáculo por apresentarem limitada difusão através das membranas e baixo coeficiente de partição. Assim, esses problemas devem ser superados para que a concentração plasmática efetiva da droga se mantenha dentro da janela terapêutica evitando o risco de desenvolvimento de microrganismos resistentes (Urbán *et al.*, 2012).

Diversos trabalhos na literatura relatam a incorporação de antimicrobianos em sistemas de liberação controlada com o objetivo de modular o seu perfil de liberação, aumentar a sua atividade ou mesmo reduzir os efeitos adversos (Roy *et al.*, 2013). A incorporação dessas moléculas nesses sistemas visa contornar os problemas acima citados, além de modular o perfil de liberação de fármacos levando ao aumento da adesão de pacientes ao tratamento devido à redução do número de intervenções e também do período de internação em hospitais. Outra vantagem está na liberação sustentada por longos períodos, mantendo a concentração plasmática do fármaco dentro da janela terapêutica, além da possibilidade de reduzir os efeitos tóxicos através do direcionamento da molécula para alvos específicos (Urbán *et al.*, 2012). Dentre as estratégias aplicadas estão o *self-assembly*, lipossomas, estruturas poliméricas, hidrogéis, nanocápsulas, nanotubos de carbono e nanofibras (Roy *et al.*, 2013; Urbán *et al.*, 2012; Mandal *et al.*, 2014b).

Um estudo avaliou as propriedades citotóxicas *in vitro* do peptídeo CT20p contra células de câncer de cólon e mama, e *in vivo* em camundongos com câncer de mama (Boohaker *et al.*, 2012). Derivado da porção C-terminal da proteína pró-apoptótica bax, que pertence à família das proteínas Bcl-2, este peptídeo contém resíduos hidrofóbicos e catiônicos que permitem a sua interação com os lipídeos das membranas. CT20p foi encapsulado em nanopartículas de polímeros super ramificados (HBPE) funcionalizadas com grupos carboxílicos (negativamente carregadas) e grupos aminos (positivamente carregadas).

In vitro, nanopartículas contendo CT20p foram capazes de induzir alterações morfológicas em células HCT-116 de câncer cólon-retal compatíveis com morte celular. Quando as células foram tratadas com o peptídeo livre, este não levou à morte celular em nenhuma das concentrações testadas, inclusive na concentração 1000 vezes maior do que aquela empregada nas nanopartículas. No experimento *in vivo*, células das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 de câncer de mama desenvolveram alterações morfológicas, como perda da integridade da membrana, após tratamento com o peptídeo encapsulado, sendo que as nanopartículas funcionalizadas com os grupos carboxílicos foram mais efetivas que as funcionalizadas com os grupos aminos (Boohaker *et al.*, 2012).

As bacteriocinas nisina e BLS-P34 foram encapsuladas em lipossomas e depois foram testadas contra *Listeria monocytogenes* inoculada em queijo minas frescal. A nisina apresenta um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-negativas e esporos de *Bacillus* e *Clostridium* spp. enquanto BLS-P34 inibe *L. monocytogenes* além de outros microrganismos. Os peptídeos foram encapsulados em lipossomas de fosfatidilcolina (PC-1) e PC-1-colesterol. Em todas as formulações testadas houve a redução da população microbiana de *L. monocytogenes* em comparação ao controle após 21 dias de estocagem do queijo minas (Malheiros Pda *et al.*, 2012).

1.4.2 Nanofibras como sistemas de liberação controlada de fármacos

Nanofibras consistem em um promissor material para aplicações biomédicas. Devido à sua similaridade com a matriz extracelular e à sua grande superfície de contato, este material tem sido usado em engenharia de tecidos, implantes médicos e sistemas de liberação controlada de fármacos (Brandelli, 2012; Dave *et al.*, 2013). Sua aplicação como sistema de liberação permite a incorporação de drogas hidrofílicas e hidrofóbicas, sendo que alterações na composição e no processo de produção podem modificar a morfologia, porosidade e liberação do fármaco (Agarwal *et al.*, 2008; Sridhar *et al.*, 2013). Também é possível a imobilização de macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos a partir da modificação da superfície das nanofibras (Yoo *et al.*, 2009).

Vários métodos estão descritos na literatura para obtenção de nanofibras (Sill e von Recum, 2008). Um deles consiste na obtenção de fibras a partir da auto-organização de peptídeos e polímeros em que um balanço entre as forças de atração e repulsão irá determinar a organização ou desorganização do material. Quando expostos a estímulos como pH, aquecimento ou força iônica, estes peptídeos se auto organizam em nanoestruturas ricas em β -

domínios devido à ação de forças hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (Liu *et al.*, 2013). Madine e colaboradores (2012) obtiveram nanofibras a partir do peptídeo amiloide modificado (AAKLVFF) em água; quando a molécula foi colocada em metanol, nanotubos foram formados ao invés de nanofibras (Madine *et al.*, 2012).

O *electrospinning* tem sido considerado um método eficiente para a produção de nanofibras em larga escala por ser de fácil manipulação e baixo custo (Brandelli, 2012). A técnica baseia-se na aplicação de uma alta voltagem entre um capilar metálico ou agulha acoplada à seringa contendo a solução polimérica e um coletor metálico. A solução polimérica é bombeada pelo capilar metálico em direção ao coletor sob a ação de um campo elétrico. Para a formação da fibra é necessário que ocorra uma repulsão eletrostática entre as cargas da solução polimérica e as forças criadas pelo campo elétrico externo, e que esta força supere a tensão superficial da solução polimérica na ponta do capilar metálico. Enquanto o jato de fibra vai em direção ao coletor metálico, o solvente é evaporado e a fibra é depositada no coletor (Agarwal *et al.*, 2008). A Figura 2 ilustra a montagem do equipamento de *electrospinning*.

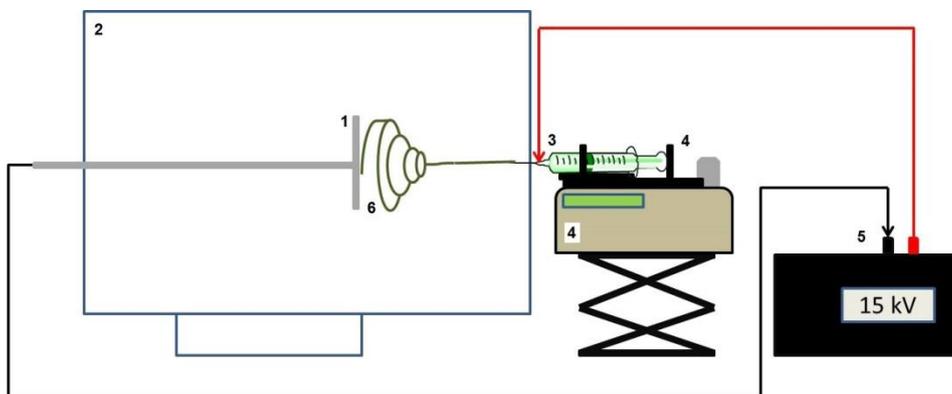


Figura 2. Desenho esquemático representando um *electrospinning*. (1) coletor metálico envolto em papel alumínio, (2) caixa acrílica fechada com pequena abertura somente para a passagem da agulha, (3) seringa contendo a solução a ser empregada para a formação das nanofibras acoplada à agulha (na agulha está acoplado o eletrodo que também é ligado à fonte de energia, (4) bomba para seringa, (5) fonte de alta voltagem e (6) nanofibras sendo formadas.

A técnica de produção de fibras por *electrospinning* pode levar a formação de nanofibras de diferentes diâmetros dependendo das condições físicas da solução polimérica, dos parâmetros utilizados no processo de *electrospinning* como a voltagem aplicada, a taxa de infusão da solução polimérica, distância entre o capilar e o coletor, ou mesmo a concentração do polímero (Agarwal *et al.*, 2008; Ignatious *et al.*, 2010; Abrigo *et al.*, 2014). Na Tabela 4 estão listados como esses parâmetros podem interferir na morfologia das fibras.

Tabela 3. Listagem dos parâmetros que podem interferir no processo de *electrospinning* e os respectivos efeitos que podem causar na morfologia e diâmetro das fibras.

Parâmetros	Efeitos na morfologia da fibra
Aumento da voltagem aplicada ao sistema	Inicialmente, ocorre uma diminuição do diâmetro da fibra e depois um aumento.
Aumento do fluxo de bombeamento da solução polimérica	Aumento no diâmetro da fibra (a formação de gotas pode ocorrer caso o fluxo esteja muito alto).
Aumento da distância entre o capilar e o coletor	Diminuição do diâmetro da fibra (a formação de gotas pode acontecer se a distância entre o capilar e o coletor for muito curta)
Aumento da concentração da solução polimérica (↑ da viscosidade)	Aumento do diâmetro da fibra
Aumento da condutividade da solução	Diminuição do tamanho da fibra (distribuição variada dos diâmetros das fibras formadas)
Aumento da volatilidade do solvente	Fibras podem exibir uma microtextura como poros em sua superfície, o que pode aumentar a sua área superficial.

Fonte: adaptado de Sill e von Recum, 2008.

Segundo Meinel e colaboradores (2012), três diferentes técnicas podem ser empregadas para a incorporação de fármacos e produção de nanofibras por *electrospinning* que irão depender (i) da solubilização do polímero e do fármaco em uma mesma solução, (ii) da incorporação do fármaco após a produção das fibras através da sua adsorção à matriz polimérica e (iii) de duas soluções poliméricas, em que a primeira contem a droga solubilizada como em (i) e a segunda contendo somente o polímero, fazendo com que a solução contendo o fármaco fique no interior da fibra e a segunda solução revestindo a primeira.

Diversos polímeros sintéticos e naturais podem ser usados na produção de fibras por *electrospinning* como o a poli (ϵ -caprolactona) (PCL) (Ruckh *et al.*, 2012), ácido poli-láctico (PLA) (Mohiti-Asli *et al.*, 2014), álcool poli-vinílico (PVA), (Ravichandran *et al.*, 2013), entre outros (Tabela 4). Como em outros sistemas de liberação sustentada que fazem o uso de polímeros, a escolha do mesmo deve ser feita de forma criteriosa segundo o perfil de liberação desejado (Sill e von Recum, 2008).

O emprego de nanofibras com atividade antimicrobiana tem sido investigado para o seu uso como curativo ou bandagem de feridas, visto que a estrutura da fibra pode proteger o material de contaminação microbiana além de ser possível a incorporação de agentes antimicrobianos, fatores de crescimento e antissépticos (Zahedi *et al.*, 2010; Bao *et al.*, 2013).

Dentre os antibióticos incorporados em nanofibras produzidas por *electrospinning* estão inclusos os compostos de prata (Lalani e Liu, 2012; Li *et al.*, 2013; Abdelgawad *et al.*, 2014), vancomicina (Chen *et al.*, 2012a; Chen *et al.*, 2012b), gentamicina (Chen *et al.*, 2012a; Chen *et al.*, 2012b; Dave *et al.*, 2013) e rifampicina (Ruckh *et al.*, 2012). Entretanto, há poucos trabalhos de peptídeos antimicrobianos incorporados em nanofibras (Sarig *et al.*, 2008; Heunis *et al.*, 2011; Lindner *et al.*, 2011; Eriksen *et al.*, 2013; Heunis *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2013; Mandal *et al.*, 2014b). Na Tabela 4 estão listados vários trabalhos que empregam moléculas com atividade antimicrobiana em nanofibras.

Tabela 4. Exemplos de nanofibras produzidas por electrospinning utilizadas em sistemas de liberação controlada.

POLÍMERO	COMPOSTO BIOATIVO	DIAMETRO DAS FIBRAS		TEMPO DE RELEASE	REFERÊNCIA
		Sem fármaco	Com fármaco		
PVA	BSA	-	-	NA	(Tang <i>et al.</i> , 2012)
Polivinilpirrolidona/Hidroxiopropil- β -ciclodextrina (PVP/HP β CD)	Clotrimazol (CZ)	-	645 a 667 nm	5 minutos	(Tonglairoum <i>et al.</i> , 2014)
PVA	Subtilosina	567 nm	278 nm	-	(Torres <i>et al.</i> , 2013)
Poliuretano (PU) - Cellulose acetato e zeína	Estreptomicina	400–700 nm ⁽¹⁾		-	(Unnithan <i>et al.</i> , 2014)
D,L-PLA	dimetiloxalilglicina (DMOG)	356 \pm 89 nm	-	60 horas	(Wang <i>et al.</i> , 2010)
Poli-(3-hidroxi-butilato) (PHB)	dimetiloxalilglicina (DMOG)	1.96 \pm 0.31 μ m	-	60 horas	(Wang <i>et al.</i> , 2010)
Ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA)/PLA/Polietilenoglicol (PEG)	Carbazocrome sulfonato de sódio Tinidazol	100 \pm 10 μ m ⁽¹⁾		7 dias	(Wang <i>et al.</i> , 2013)
PLA	BSA em microesferas de alginato de sódio	2.21 \pm 1.15 μ m ⁽¹⁾		120 horas	(Qi <i>et al.</i> , 2006)
PCL	Ácido 12-hidroxi-dodecanoico	600 \pm 50 nm	350 \pm 50 nm	-	(Romeo <i>et al.</i> , 2007)
PCL	Rifampicina	557 \pm 399 nm	10 % 402 \pm 225 nm 20 % 665 \pm 402 nm	8 horas	(Ruckh <i>et al.</i> , 2012)

PVP	Iodo	2.49 a 6.42 μm	4.34 a 6.08 μm	24 horas	(Sebe <i>et al.</i> , 2013)
PCL/poli-hidroximetil-glicolide	BSA/VEGF ⁽²⁾	Around 700 nm		35 dias	(Seyednejad <i>et al.</i> , 2012)
PVA	Insulina	300 a 400 nm	500 a 700 nm	10 horas	(Sharma <i>et al.</i> , 2013)
PVA	Microemulsão de elgenol	50 a 340 nm	30 a 160 nm	300 minutos	(Kriegel <i>et al.</i> , 2009; Kriegel <i>et al.</i> , 2010)
Copolímero de ácido metacrilado	Uranina	751.5 \pm 67.2 nm	703.3 \pm 71.2 nm	480 minutos	(Hamori <i>et al.</i> , 2014)
Copolímero de ácido metacrilado	Nifedipina	751.5 \pm 67.2 nm	2477.8 \pm 206.1 nm	480 minutos	(Hamori <i>et al.</i> , 2014)
PCL/PVP	KAB ⁽³⁾ /KAU ⁽⁴⁾	-	648 a 702 nm	50 horas	(Han e Steckl, 2013)
D,L-PLA/ Óxido de polietileno (PEO)	Plantaricina 423	-	200 a 450 nm	8 dias	(Heunis <i>et al.</i> , 2011)
D,L-PLA/ Óxido de polietileno (PEO)	Nisina	466 \pm 104 nm	330 \pm 79 nm	4 a 9 dias	(Heunis <i>et al.</i> , 2013)
PLA	Triclosan/ciclodextrina	140 a 900 nm	210 a 2070 nm	24 horas	(Kayaci <i>et al.</i> , 2013)
PLGA	Cefoxitina sódica	360 \pm 220 nm	260 \pm 90 nm	7 dias	(Kim <i>et al.</i> , 2004)
PVA	BSA	-	250 a 300 nm	2 a 30 horas	(Zeng <i>et al.</i> , 2005)
PEG/PCL	BSA	-	270 nm A 380 nm	5 meses	(Zhang <i>et al.</i> , 2006b)
PEO	Sulfato de estreptomina		130 \pm 25 nm		
PCL	Isoniazida	-	230 \pm 87 nm	24 horas	(Hassounah <i>et al.</i> , 2013)
PVA	Pirazinamida Claritromicina ⁽⁵⁾		106 \pm 16 nm		
Poli(sulfobetaína metacrilada)	Nitrato de prata	1110.4 \pm 145.8 nm ⁽¹⁾		24 horas	(Lalani e Liu, 2012)

¹ Não diferenciado entre fibras controle e fibras contendo o fármaco.

² VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

³ KAB: *keyacid blue*

⁴ KAU: *keyacid uranine*

⁵ Os fármacos foram incorporados separadamente em cada um dos polímeros utilizados.

2 ESCOPO DA TESE

Este trabalho está fundamentado no fato que os peptídeos antimicrobianos representam uma ferramenta a ser empregada no tratamento e controle de infecções hospitalares. Uma lista de trabalhos relata a importância dessas moléculas como uma nova possibilidade no combate dessas infecções. Entretanto, ainda há muitos entraves a serem superados até que essas moléculas possam estar disponíveis comercialmente. Dessa forma, este trabalho busca colaborar no estudo e aplicabilidade dessas moléculas como possíveis antimicrobianos a serem utilizados contra infecções nosocomiais.

A **Introdução** contém uma ampla revisão bibliográfica sobre infecções associadas aos serviços de saúde e o seu impacto sobre os serviços de saúde. Logo depois, uma revisão sobre peptídeos antimicrobianos é apresentada, juntamente com o estado da arte compreendendo os mecanismos de ação e as estratégias que têm sido desenvolvidas com o objetivo de tornar estas promissoras moléculas comercialmente disponíveis. A expressão heteróloga de peptídeos antimicrobianos é apresentada como uma possível ferramenta a ser empregada com o objetivo de produzi-las em quantidade suficiente para o aprofundamento dos estudos. A nanobiotecnologia, da mesma forma que a expressão heteróloga é discutida a partir da sua aplicação em possibilitar a melhoria das condições farmacocinéticas da molécula em estudo além de descrever uma série de fármacos e peptídeos antimicrobianos empregados em sistemas de liberação controlada de fármacos.

O **Capítulo 1** consiste na descrição das estratégias de clonagem, expressão e purificação utilizadas para a produção do peptídeo antimicrobiano Pg-AMP1, extraído inicialmente da semente da goiaba (*Psidium guajava*), cuja atividade contra bactérias patogênicas ao homem causadoras de infecção hospitalar foi descrita. O peptídeo foi expresso em *Escherichia coli* e transientemente em *Nicotiana benthamiana*.

O **Capítulo 2** mostra a produção de nanofibras por *electrospinning* contendo o peptídeo antimicrobiano Cm-p1 para a sua aplicação como sistema de liberação controlada de fármacos. As nanofibras foram caracterizadas e o perfil de liberação do peptídeo foi avaliado. Ensaio de biocompatibilidade das nanofibras contendo o peptídeo foram realizados com células humanas. Este peptídeo, já descrito anteriormente, apresenta atividade contra *Candida albicans*, um importante patógeno oportunista também causador de infecções nosocomiais.

**CAPÍTULO 1 – EXPRESSÃO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO PG-AMP1 EM
ESCHERICHIA COLI E *NICOTIANA BENTHAMIANA***

1 INTRODUÇÃO

Dentre os diversos peptídeos com atividade antimicrobiana conhecida estão as proteínas ricas em glicina (PRG). Essas proteínas são comumente encontradas no tecido vascular vegetal (Keller *et al.*, 1988) no cotilédono, caule e pecíolo (Ye e Ng, 2000) e foram descritas, primeiramente, como proteínas de armazenamento e, atualmente, despontam como um novo grupo de moléculas de origem vegetal com atividade antimicrobiana. Estas moléculas podem ser armazenadas até que sejam requeridas como componente antimicrobiano de defesa das plantas. Quando não estão participando do sistema de defesa, as PRGs podem funcionar como fonte de aminoácidos essenciais (Mousavi e Hotta, 2005; Pelegrini *et al.*, 2008). Além disso, há trabalhos que relatam atividade fungicida dessas moléculas contra fungos fitopatogênicos (Egorov *et al.*, 2005).

Fatores biológicos, físicos e químicos podem modular a expressão das PRG em plantas (Sachetto-Martins *et al.*, 2000). Relatos sugerem que a expressão dessas proteínas pode estar relacionada ao stress induzido por mudanças ambientais como aumento da tolerância ao frio e desidratação, tratamentos hormonais e injúria (Kwak *et al.*, 2005) e também podem agir como fatores de ligação ao RNA (Shinozuka *et al.*, 2006).

Pelegrini e colaboradores (2008) isolaram e purificaram uma PRG de sementes de goiaba (*P. guajava*) e a classificaram como pertencente ao terceiro grupo das PRG, segundo a classificação¹ adotada para caracterizá-las, já que esta PRG (Pg-AMP1) apresentou um elevado conteúdo de resíduos de glicina, embora não apresentasse nenhum dos seus domínios conservados como as PGRs de *Oryza sativa* e *Zea mays*. Após o sequenciamento completo da proteína, que revelou um peptídeo com 55 resíduos de aminoácidos, este foi alinhado a outras seqüências de PRG como mostrado na Figura 1.

¹ “As PGR podem ser caracterizadas pelo alto conteúdo de glicina na sua estrutura primária ... sendo classificadas dentro de três grupos principais, de acordo com o conteúdo de glicina e a presença de domínios conservados. ... o primeiro grupo contém proteínas que apresentam mais de 70% de sua seqüência com glicinas. Proteínas com domínios adjacentes aos domínios com quantidades menores de resíduos de glicina pertencem ao segundo grupo. ... um terceiro grupo ... inclui proteínas com conteúdo elevado de glicinas, sem os domínios particularmente ricos em glicina.” (Ringli *et al.*, 2001).

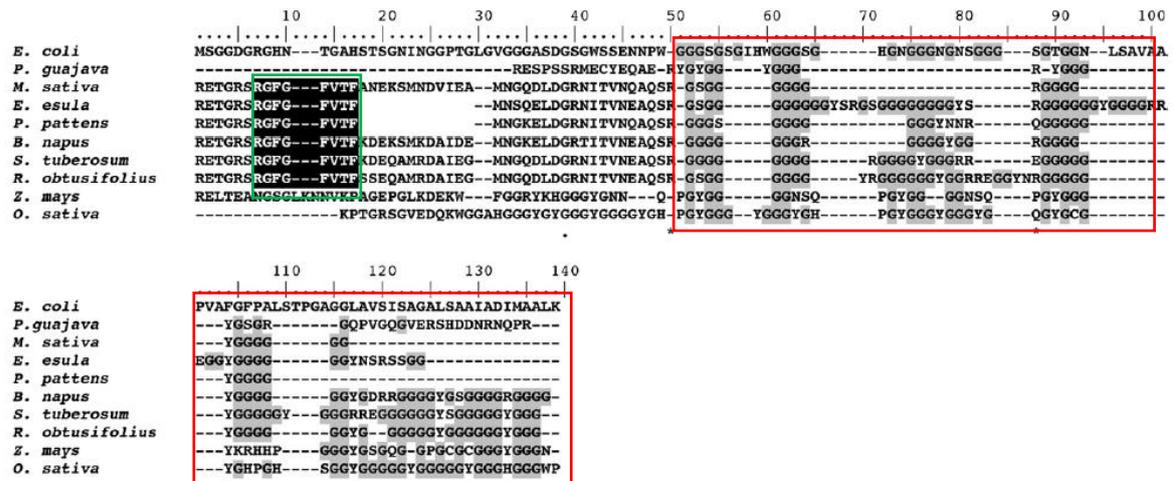


Figura 3. Alinhamento do Pg-AMP1 e sete outras proteínas ricas em glicina de plantas e colicina E3 de *E. coli*. Delimitadas em vermelho estão as regiões ricas em glicina. Em verde estão as sequências de reconhecimento de RNA. Adaptado de Pelegrini *et al.*, 2008.

Os ensaios de modelagem molecular revelaram um peptídeo composto de duas α -hélices, uma na porção N-terminal e outra na porção C-terminal, com um *loop* entre elas. A molécula apresenta grande flexibilidade devida, principalmente, à grande parte dos resíduos de glicina localizados no *loop* entre as duas α -hélices. Os resíduos de arginina, presentes nas extremidades das α -hélices, conferem carga positiva a esta região, enquanto os resíduos hidrofóbicos observados ao longo da estrutura são importantes para a dimerização da molécula. Estudos complementares de expressão e modelagem do Pg-AMP1 também foram desenvolvidos (Tavares *et al.*, 2012; Porto *et al.*, 2014).

Após determinar a estrutura do Pg-AMP1, foram realizados bioensaios contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os bioensaios realizados contra bactérias Gram-negativas revelaram efeitos deletérios contra *Klebsiella sp.* e *Proteus sp.*, com 90% e 30% de inibição do crescimento bacteriano, respectivamente. Entretanto, bioensaios realizados contra bactérias Gram-positivas e fungos fitopatogênicos não mostraram nenhuma atividade inibitória. Esta foi a primeira vez que uma PRG apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas patogênicas ao homem. Entretanto, como citado anteriormente, estas moléculas são produzidas em pequenas quantidades pelas plantas. A produção de peptídeos antimicrobianos por técnicas biotecnológicas permite a sua produção em grande escala para que seja possível o seu uso em estudos e no desenvolvimento de biofármacos.

2 JUSTIFICATIVA

Na última década, a urgência na busca de novos e eficientes medicamentos para o combate das infecções hospitalares, emergiu em função do desenvolvimento de mecanismos de resistência em microrganismos patogênicos. Os peptídeos antimicrobianos surgem como uma potencial classe de substância a ser utilizada na prevenção e controle de infecções por apresentarem tanto atividade bactericida quanto imunoprotetora. Esses peptídeos podem ser encontrados em diversas fontes na natureza como fungos, plantas, animais vertebrados e invertebrados, sendo que diversos estudos já demonstraram serem raros os episódios de resistência aos antibióticos naturais. Entretanto, estas moléculas estão presentes em concentrações muito baixas inviabilizando a sua utilização a partir da purificação de fontes naturais ou síntese química. Dessa forma, a produção desses peptídeos por técnicas biotecnológicas permite que os mesmos sejam produzidos e empregados em estudos de estrutura-função e mecanismos de ação. O peptídeo Pg-AMP1, extraído da semente da goiaba, apresentou atividade contra bactérias Gram-negativas patogênicas ao homem causadoras de infecção hospitalar, surgindo como uma alternativa viável à prevenção e combate dessas infecções.

3 HIPÓTESE

A expressão do peptídeo antimicrobiano Pg-AMP1 em *Escherichia coli* e *Nicotiana benthamiana*, fusionado ou não a proteínas estabilizadoras pode permitir a produção de moléculas ativas em quantidade suficiente para que mesmas possam ser incorporadas em sistemas de liberação controlada de fármacos.

4 OBJETIVO GERAL

Expressar heterologicamente e avaliar a atividade biológica do peptídeo Pg-AMP1 formulado contra bactérias patogênicas visando à prevenção e controle de microrganismos causadores de infecção hospitalar.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ▶ Expressar o peptídeo antimicrobiano Pg-AMP1 em *E. coli* e *N.benthamiana*;
- ▶ Purificar o Pg-AMP1 por cromatografia de afinidade;
- ▶ Avaliar a efetividade do peptídeo contra bactérias patogênicas humanas.
- ▶ Produzir a proteína heteróloga ativa contra bactérias e em quantidade suficiente para ser utilizada na produção de nanopartículas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 EXPRESSÃO DO PG-AMP1 EM *ESCHERICHIA COLI* – VETOR PQE30

5.1.1 Construção do gene sintético

O gene que codifica o peptídeo Pg-AMP1 foi sintetizado de acordo com a sequência de aminoácidos do peptídeo isolado de sementes de goiaba (*Psidium guajava*) por Pelegrini e colaboradores (2008) pela empresa Eptech Biolabs (www.epochlifescience.com), no vetor pUC18. Uma cauda de histidina (His-6) foi adicionada à extremidade N-terminal do peptídeo visando facilitar a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Também foram adicionadas à sequência codificadora do peptídeo a sequência de restrição da enzima *Bam*HI na extremidade 5' e a sequência de restrição da enzima *Hind*III na extremidade 3' para a realização de posterior subclonagem. Em uma primeira etapa, a sequência foi subclonada no plasmídeo pQE30 sob o controle do promotor híbrido T5/*lac*, formando um cassete de expressão pQE30-6His-Pg (Figura 4) de 198 pares de base, sendo 165 pares de bases correspondentes ao peptídeo formando o cassete de expressão.

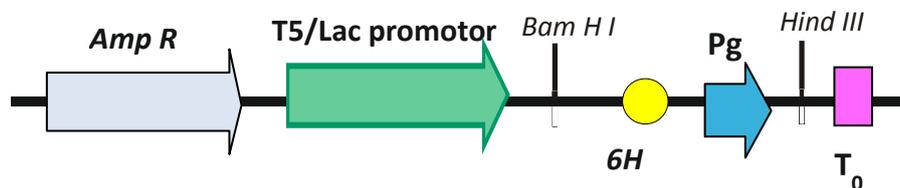


Figura 4. Cassete de expressão do Pg-AMP1 no vetor pQE30. A construção está inserida no vetor pQE30 sob controle do promotor híbrido T5/*Lac*. O Pg tem fusionado à sua extremidade N-terminal 6 histidinas. O peptídeo e o His-tag foram clonados nos sítios de restrição *Bam*HI e *Hind*III. O pQE30 tem o gene da ampicilina como marca de seleção.

5.1.2 Transformação genética e produção de DNA plasmidial

O gene pQE30-6His-Pg foi transformado em células de *E. coli*, linhagem XL1-blue por eletroporação e posterior plaqueamento em meio Luria Bertuli (LB) contendo 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ampicilina. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h. A clonagem foi confirmada por PCR de colônia usando oligos iniciador e terminador do pQE30. As colônias positivas para o inserto foram então inoculadas em meio LB líquido e ampicilina 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ à mesma temperatura e tempo, e procedeu-se à extração do DNA plasmidial.

5.1.3 Expressão do peptídeo recombinante em *E. coli* linhagem M15.

As primeiras tentativas de expressão do pQE30-6His-Pg foram realizadas utilizando esta construção em células de *E. coli* na linhagem M15, transformadas por eletroporação e plaqueamento em meio Luria Bertani (LB) e ampicilina 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h. A clonagem foi confirmada por PCR de colônia usando os mesmos oligos para confirmação do inserto. Duas colônias positivas para o inserto foram então inoculadas em 3 ml de meio LB líquido e ampicilina 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e canamicina à mesma temperatura e tempo. As culturas crescidas foram então reinoculadas, diluídas 20 vezes, em meio LB e ampicilina 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, à 37 °C até atingir a densidade ótica (OD_{600}) entre 0,6 e 0,8. Após atingir a OD_{600} , uma alíquota de 1,5 ml de cada cultura foi retirada (T_0) e o restante induzido pela adição de IPTG (isopropil- β -D-galactopiranoside) à concentração final de 1 mM. Durante o período de indução, o inóculo foi mantido a 37 °C e 180 rpm e alíquotas foram retiradas em tempos pré-determinados após duas e quatro horas de indução respectivamente. Depois das alíquotas retiradas, estas foram centrifugadas por 1 min a uma velocidade de 12.000 g e armazenadas a -80 °C. O precipitado das bactérias armazenado a -80 °C foi recuperado em 150 μl de tampão de amostra 1 X (Tris-HCl 125 mM; SDS 4 %; β -mercaptoetanol 10 %; glicerol 20 % e azul de bromofenol 0,04 %) e aquecido a 95 °C por 5 min. Alíquotas de 20 μl das amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS PAGE 15 %) (Laemmli, 1970) a 70 V e 15 mA. Após a corrida do gel deu-se prosseguimento à técnica de *Western-Blot* (Burnette, 1981; Harlow e Lane, 1988).

5.1.4 Confirmação da expressão heteróloga

A técnica de *Western-blot* (Burnette, 1981, Harlow e Lane, 1988) foi utilizada para a detecção do peptídeo recombinante. Inicialmente foi conduzido gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15 % (Laemmli, 1970) para detecção de proteínas. Depois da corrida procedeu-se à transferência semi-seca do gel para uma membrana de PVDF (Immobilon P) sendo que as condições de transferência utilizadas foram de 15 V e 200 mA por 1 h, em tampão de transferência (Tris-base 48 mM; glicina 39 mM; SDS 1,3 mM e metanol 20 %). O bloqueio dos sítios inespecíficos da membrana foi feito 3 % de soro de albumina bovina (BSA) em PBS 1 X por 1 h sob agitação. Depois a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal Anti-His (1:4000 em 1 % BSA em PBS 1 X, tween 0,1 %; Sigma) conjugado com fosfatase alcalina, por 1 h sob agitação. A membrana foi lavada sob leve agitação em PBS por 30 min.

A revelação foi feita em solução de NBT/BCIP (Roche) incubando-se a membrana em 10 ml de tampão de revelação (tris-HCl 0,1 M, pH 9,5, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 0,05 M) que continha diluído 200 µl da solução estoque (Burnette, 1981; Harlow e Lane, 1988).

5.2 EXPRESSÃO DO PG-AMP1 POR GATEWAY EM *E. COLI*

5.2.1 Construção do gene sintético

O gene que codifica o peptídeo Pg-AMP1 foi sintetizado pela empresa Epotech Biolabs (www.epochlifescience.com), de acordo com a sequência de aminoácidos do peptídeo isolado de semente de goiaba (*P. guajava*) por Pelegrini e colaboradores (2008). Este gene sintético foi desenhado com sítios enzimáticos diferentes assim como iniciadores e terminadores em posições de modo a possibilitar a expressão do Pg-AMP1 em diferentes sistemas heterólogos conforme pode ser observado na Figura 5. A construção continha uma cauda de histidina (6-His) na região N-terminal para facilitar a identificação da proteína pela técnica de *Westen-blot* e a sua purificação por coluna de níquel. Dois peptídeos sinais: (1) o KDEL, que retém o peptídeo no retículo endoplasmático e o (2) KAPPA (K) que direciona o peptídeo para o retículo, também foram adicionados à construção do gene sintético (Figura 5) sendo que a construção ficou da seguinte forma pBSK- att1-K-6His-Pg-KDEL-att2.

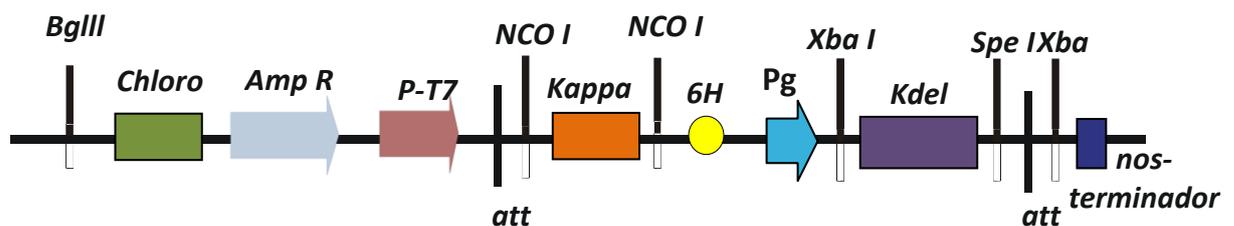


Figura 5. Casete de expressão contendo a sequência do *pg-amp1* sintético que foi clonado no vetor pBSK sob controle do promotor T7. No gene estão presentes os sítios de recombinação *att1* e *att2*, o peptídeo sinal KAPPA para direcionamento para o retículo endoplasmático, o *tag* contendo 6 histidinas (6H) na porção N-terminal do Pg-AMP1. O peptídeo sinal KDEL de retenção no retículo endoplasmático está clonado na porção C-terminal do Pg-AMP1 e o códon de terminação *nos*. Na construção também foram inseridos os sítios de restrição que possibilitaram as estratégias de sub-clonagens empregadas e o peptídeo sinal CHLORO de direcionamento da expressão do peptídeo para o cloroplasto. O pBSK tem como marca de seleção o gene da ampicilina.

5.2.2 Construção do vetor de clonagem

O vetor PBSK-K-6His-Pg-KDEL foi recombinado com o vetor específico para clonagem pDONR207 através do emprego da tecnologia Gateway® (Invitrogen), utilizando a enzima clonase II, sem a necessidade do uso de enzimas de restrição, mas que mantém o gene de interesse na orientação e janela de leitura correta. Foi gerado, assim, o vetor pDONR207-K-6His-Pg-KDEL (Figura 6).

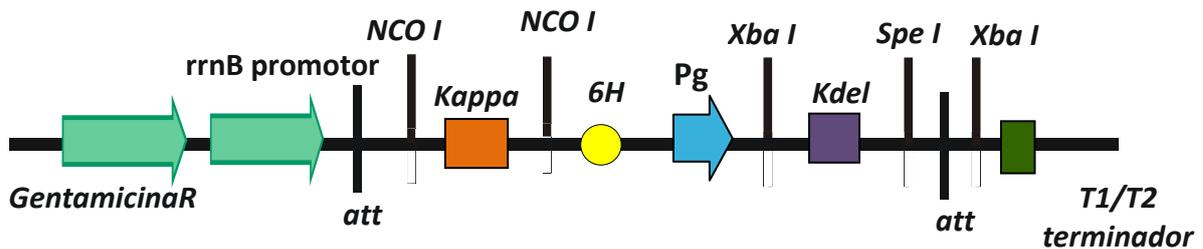


Figura 6. Cassete do vetor de recombinação pDONR207-K-6His-Pg-KDEL: vetor formado a partir da recombinação entre o PBSK-CHLORO-K-6His-Pg-KDEL com o vetor pDONR207. No gene estão presentes os peptídeos sinais KAPPA (entre dois sítios de restrição da enzima *NcoI*) e o KDEL (entre os sítios de restrição das enzimas *XbaI* e *SpeI*). A gentamicina é o gene de resistência do pDONR. A construção está sob controle do promotor *rrnB*.

Visando preparar o vetor para a recombinação com o vetor específico para expressão em bactérias, foi necessário retirar os peptídeos sinais KDEL e KAPPA por meio de digestões com enzimas de restrição, uma vez que esses peptídeos sinais poderiam interferir na expressão em sistema procarioto. O vetor pDONR207-K-6His-Pg-KDEL foi então digerido para a retirada dos peptídeos sinais, formando o vetor pDONR207-6His-Pg (Figura 7). O KAPPA foi removido através de digestão com a enzima *NcoI* e o KDEL com as enzimas *XbaI* e *SpeI*. O processo de digestão seguiu as condições específicas da marca da enzima sendo o volume final de 30 µl em tampão específico na concentração final 1 X, deixando a reação por no mínimo 1 h a 37 °C. As digestões foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1 %. Para confirmar a saída dos peptídeos sinais, foram realizadas novas digestões com as mesmas enzimas utilizadas para a retirada.

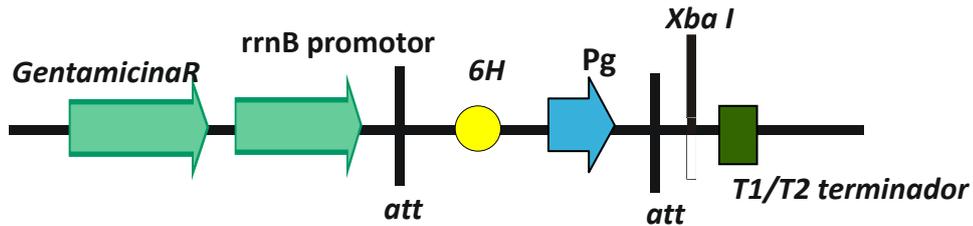


Figura 7. Cassete do vetor de recombinação pDONR207-6His-Pg: vetor formado a partir das digestões com as enzimas *NcoI*, *XbaI* e *SpeI* para a retirada dos peptídeos sinais.

5.2.3 Transformação genética de células de *E. coli* XL1-blue e extração de DNA plasmidial

Inicialmente foi realizada a reação de recombinação do gene ao vetor de recombinação seguindo o protocolo de *Gateway*® da Invitrogen. A reação continha um volume final de 5 μl , sendo 50-150 ng do vetor PBSK, 150 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ do vetor pDONR207, 0,5 μl (1 X) da enzima LR clonase II e TE, pH 8,0 (tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0) em quantidade suficiente para 5 μl formando o vetor pDONR207-K-6His-Pg-KDEL (Figura 6). A reação foi deixada em repouso a temperatura ambiente por 1 h e depois se procedeu à confirmação da reação de recombinação através de técnicas de biologia molecular que incluem a transformação genética por eletroporação (linhagem de *E. coli* XL1-blue), seguido por plaqueamento em meio LB (Meio Luria Bertani) com gentamicina 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. A transformação foi incubada 37 °C por 16 h e após esse período, colônias foram inoculadas aleatoriamente e crescidas em 3 ml de meio LB líquido com o mesmo antibiótico, pelo mesmo período e temperatura sob agitação a 180 rpm. Depois de crescido o inóculo, obteve-se o DNA plasmidial por meio da técnica Mini-prerpreparação (Sambrook e Russell, 2001). Este por sua vez foi recuperado em água e quantificado por eletroforese em gel de agarose a 1%. O vetor pDONR207-6His-Pg (Figura 7) também foi transformado usando os mesmos procedimentos acima descritos.

5.2.4 Expressão heteróloga em *E. coli* BL21 (DE3) *plysS*

5.2.4.1 Construção do vetor de expressão e confirmação da expressão heteróloga

Para a expressão da proteína realizou-se o processo de recombinação via *Gateway*® do vetor pDONR207-6His-Pg (Figura 7) juntamente com o vetor de expressão pDEST15-

GST que contém a proteína glutationa-S-transferase (GST). Esta é uma proteína já fusionada ao vetor pDEST15 que confere uma maior estabilidade ao peptídeo e consequentemente pode produzir um aumento na eficiência da expressão. A reação de recombinação foi igual à descrita no item 5.1.4 formando o pDEST15-GST-6His-Pg (Figura 8). O vetor de expressão pDEST15-GST-6His-Pg foi transformado por eletroporação em *E. coli* BL21 (DE3) plysS e, posteriormente, foi adicionado ao cultivo, IPTG na concentração final de 1 mM para indução do promotor T7. A cultura transformada foi plaqueada em meio LB sólido contendo ampicilina a $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e incubada a 37°C por 16 h. O uso da tecnologia de Gateway dispensa a confirmação dos clones positivos devido a presença do gene *ccdb* flanqueado pelos sítios de recombinação que é tóxico para as linhagens XL1-Blue e BL 21 (DE3) pLys S. Dessa forma, os clones não recombinados não crescem devido não apresentarem a marca de seleção do gene de interesse.

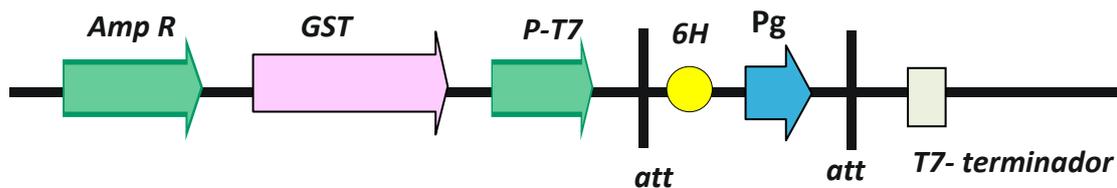


Figura 8. Cassete do vetor de expressão em bactéria pDEST15-GST-6His-Pg. O pDEST15 tem a GST fusionada à sua sequência. O vetor está sob controle do promotor T7 e tem a ampicilina como gene de resistência. O His-tag e o Pg estão inseridos entre os sítios de recombinação.

Uma colônia isolada foi inoculada em LB líquido contendo os antibióticos de resistência, da célula BL21 (DE) plysS (cloranfenicol $34 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e o do vetor pDEST15 (ampicilina $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e incubada a 37°C por 16 h a 180 rpm. 400 μl da cultura crescida foram re-inoculados em 20 ml de meio LB líquido e ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) até atingir a OD_{600} entre 0,6 e 0,8. Após atingir a OD, uma alíquota de 1,5 ml de cada cultura foi retirada (T_0) e o restante induzido pela adição de IPTG à concentração final de 1 mM. Durante o período de indução, o inóculo foi mantido a 37°C e 180 rpm e alíquotas foram retiradas em tempos pré-determinados após duas e quatro horas de indução, respectivamente. Depois das alíquotas retiradas, estas foram centrifugadas por 1 min a velocidade de 12.000 g e armazenadas a -80°C . O precipitado das bactérias armazenado a -80°C foi recuperado em 150 μl de tampão de amostra 1 X (tris-HCl 125 mM; SDS 4 %; β -mercaptoetanol 10 %; glicerol 20 % e azul de bromofenol 0,04 %) e aquecido a 95°C por 5 min. Alíquotas de 20 μl das amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15 %) utilizando uma

voltagem de 70 V e 15 mA. A malha do gel foi retirada e deu-se prosseguimento a condução do *Western-Blot* como previamente descrito no tópico 5.1.4.

5.2.4.2 Determinação da solubilidade da proteína expressa

Após confirmar a expressão do peptídeo recombinante, a cultura do clone positivo foi inoculada em 10 ml de meio LB líquido contendo ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e cloranfenicol ($34 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e crescida por 16 h, a 37°C e 180 rpm. Uma alíquota de 6 ml foi retirada e adicionada em um erlenmeyer contendo 300 ml de meio LB com ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) até atingir a OD_{600} entre 0,6 e 0,8. Ao atingir a OD, retirou-se uma amostra de 50 ml (T_0) e adicionou-se o indutor IPTG na concentração final de 1 mM ao restante da cultura. Durante o período de indução, o inóculo foi mantido a 37°C e 180 rpm, e alíquotas de 50 ml foram retiradas de hora em hora até completar 4 h de indução. Assim que foram retiradas, as amostras foram centrifugadas por 1 min a 12.000 g e armazenadas a -80°C . O precipitado das bactérias armazenado a -80°C foi recuperado em 5 ml de tampão de lise (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH 8,0) e submetido a ultra-som 6 vezes a 200 W por 10 s com intervalos de 10 s. O lisado das células foi centrifugado a 10000 g por 30 min a 4°C . O sobrenadante, que continha a fração solúvel do peptídeo expresso, foi separado do precipitado formado no qual estava presente a fração insolúvel do peptídeo. A fração insolúvel foi novamente recuperada em 5,0 ml do mesmo tampão de lise. As frações solúveis e insolúveis do peptídeo recombinante foram quantificadas por Bradford (1976). Depois de quantificadas, 100 μg de proteína total foram precipitadas com acetona e o precipitado foi recuperado em 20 μl tampão de amostra 1 X (tris-HCl 125 mM; SDS 4 %; β -mercaptoetanol 10 %; glicerol 20 % e azul de bromofenol 0,04 %) e aquecido a 95°C por 5 min. Alíquotas de 20 μl das amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15 %) (Laemmli, 1970). Após a corrida do gel foi conduzido o *Western-Blot* para detecção da expressão do peptídeo recombinante como descrito no tópico 5.1.4.

5.2.4.3 Purificação da proteína recombinante

Para a purificação do peptídeo recombinante 1 litro da cultura contendo o pDEST15-GST-6His-Pg foi induzida por 2 h. Esse tempo foi escolhido por apresentar o melhor nível de expressão do peptídeo em sua forma solúvel. A cultura induzida foi então centrifugada a 10000 g por 30 min a 4°C . Cada grama do precipitado foi congelado e descongelado no gelo

e recuperado em 3 ml de tampão de lise (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8,0). Adicionou-se PMSF à concentração final de 1 mM, 1 mg.ml⁻¹ de lisozima e 40 mg.ml⁻¹ de ácido deoxicólico e incubou-se o extrato no gelo por 30 min. O extrato foi sonificado com pulsos de 10 s a 200 W e intervalos de descanso de 10 s no gelo. 5 µg.ml⁻¹ de DNase e 10 µg.ml⁻¹ de RNase A foram adicionados e incubou-se no gelo por 15 min. O lisado foi centrifugado a 10000 g por 30 min a 4 °C para a remoção dos restos celulares. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 45 µm e dialisado por 24 h em câmara fria a 7 °C. A purificação do peptídeo foi feita por cromatografia de afinidade em coluna de Glutathione-Sepharose GStap FF (GE) de 1 ml. A coluna foi equilibrada com 10 ml de tampão de ligação (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,3) e 10 ml da amostra dialisada foi aplicada na coluna. A coluna foi lavada com o mesmo tampão de ligação e a amostra foi eluída em 10 ml de tampão de eluição (50 mM tris-HCl, 10 mM de glutathione reduzida, pH 8,0). O peptídeo purificado foi quantificado por Bradford (1976) e 100 µg de proteína total das frações do filtrado e do eluído da coluna, da fração solúvel e do extrato total bacteriano após 2h de indução foram recuperados em 20µl de tampão 1x (tris-HCl 125 mM; SDS 4 %; β-mercaptoetanol 10 %; glicerol 20 % e azul de bromofenol 0,04 %) e aplicados em gel de poliacrilamida 15 % de acordo com Laemmli (1970).

5.2.4.4 Bioensaios contra bactérias

Os ensaios bacterianos foram realizados em micro-placas usando culturas crescidas em meio LB. Água destilada e GST (Sigma) foram usadas como controle negativo e cloranfenicol como controle positivo. O crescimento bacteriano foi medido em intervalos regulares de hora em hora a 595 nm. A concentração inibitória mínima foi obtida de acordo com Park e colaboradores (1996). As bactérias foram crescidas em *tryptic soy broth* (TSB) a 37 °C e a inibição do crescimento foi medida pela turbidez a 595 nm (Bulet *et al.*, 1991). O peptídeo e a GST foram dissolvidos em água Milli-Q estéril e diluições seriadas foram feitas. As concentrações padrões usadas para o ensaio foram 16, 32, 64, 128, 256 e 512 mg.ml⁻¹. A concentração inibitória mínima (MIC) foi avaliada pela medida da turbidez a 595 nm de 30 em 30 min até completar 12 h, após todas as culturas terem alcançado a fase estacionária de crescimento. A menor concentração do peptídeo em que não ocorreu o crescimento da cultura foi definida como o valor do MIC (Park *et al.*, 1996).

5.3 EXPRESSÃO DO PG-AMP1 POR GATEWAY *NICOTIANA BENTHAMIANA*

Um fluxograma é apresentado na Figura 9 resumizando as estratégias de clonagens utilizadas para expressão do Pg-AMP1.

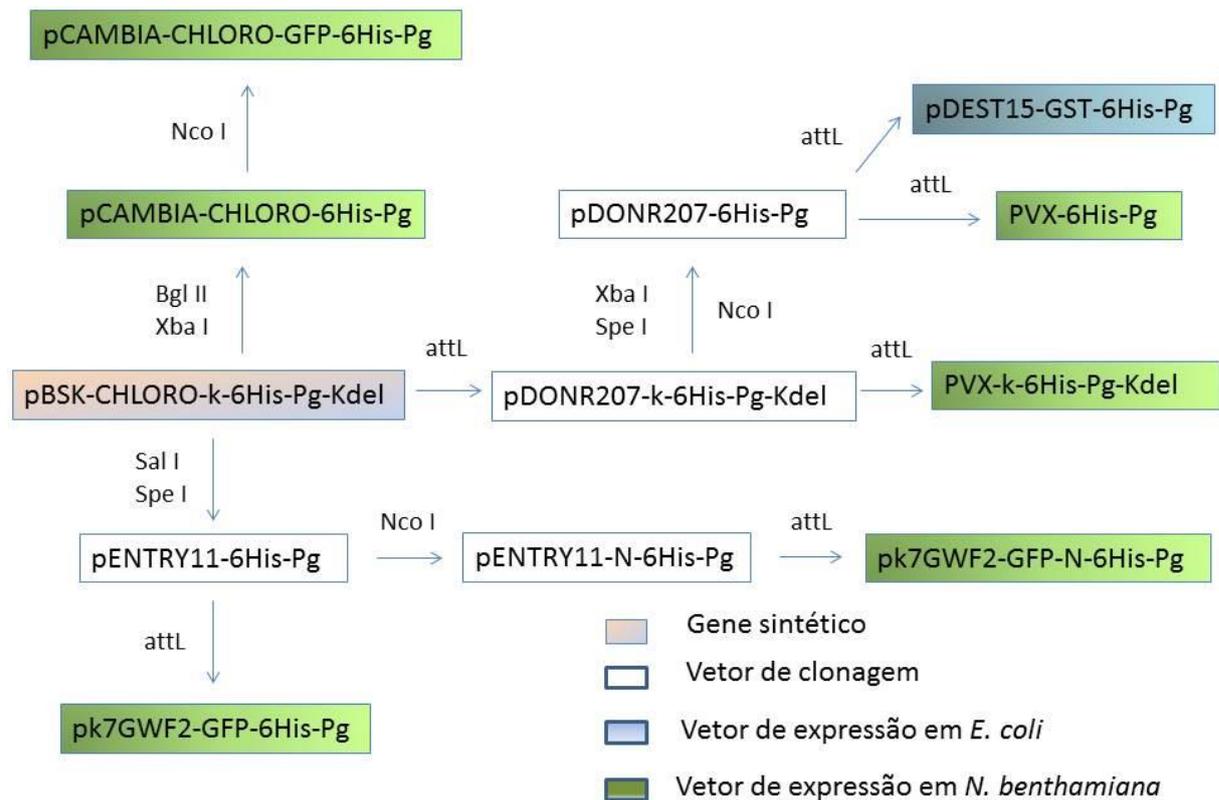


Figura 9. Fluxograma esquemático das construções utilizadas para clonagem e expressão do Pg-AMP1 em *E. coli* e *N. benthamiana*.

5.3.1 Construção do vetor de expressão, utilizando o vetor viral PVX

Para a expressão em *Nicotiana benthamiana* com o vetor viral PVX, os vetores pDNOR207-K-6His-Pg-KDEL (Figura 6) e pDNOR207-6His-Pg (Figura 7) foram recombinados ao vetor viral PVX, formando os vetores de expressão PVX-K-6His-Pg-KDEL (Figura 10a) e PVX-6His-Pg (Figura 10b). Depois de recombinados os vetores foram eletroporados em *Agrobacterium tumefaciens* linhagem EHA 105 e plaqueados em meio LB sólido contendo rifampicina ($100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e canamicina ($100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e crescidos a 28°C por 48 h.

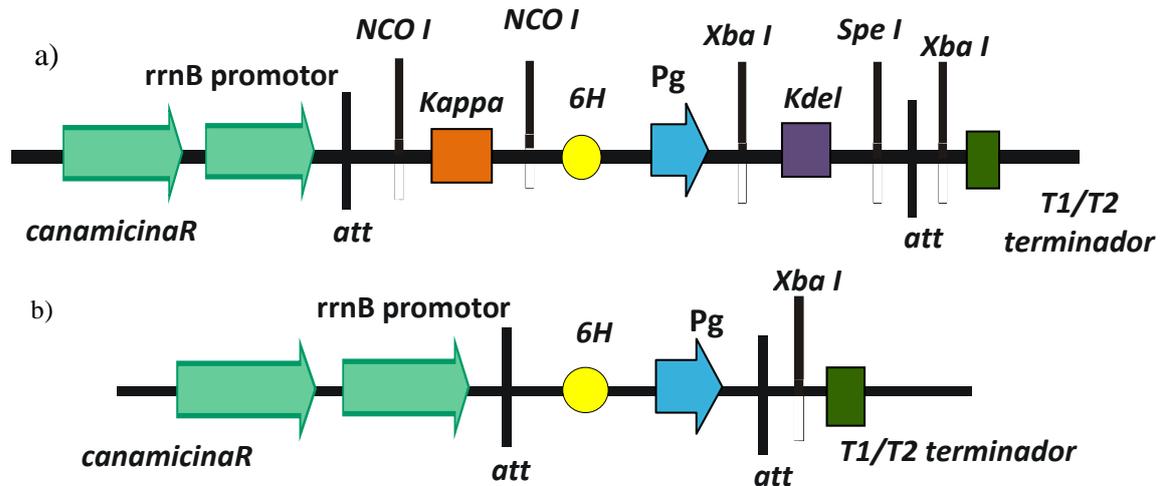


Figura 10. Cassetes de expressão dos vetores virais de expressão em planta. (a) PVX-K-6His-Pg-KDEL: vetor formado a partir da recombinação do pDNOR207- K-6His-Pg-KDEL com o vetor viral PVX. A construção mantém os peptídeos sinais KAPPA e KDEL para direcionamento e retenção do peptídeo no retículo endoplasmático. O vetor está sob o controle do promotor 35S e tem a canamicina como gene de resistência. (b) PVX-6His-Pg: vetor sem os peptídeos sinais KAPPA e KDEL direcionando a expressão da proteína para o citoplasma.

5.3.2 Construção do vetor de expressão, utilizando o vetor binário pCAMBIA

O vetor pBSK-K-6His-Pg-KDEL (Figura 5) foi digerido com as enzimas *Xba*I e *Bgl*III para a retirada do fragmento CHLORO-6His-Pg (219 pb) que foi posteriormente clonado no vetor binário pCAMBIA já digerido, anteriormente, com *Spe*I e *Bgl*III formando o vetor pCAMBIA-CHLORO-6His-Pg (Figura 11a). Posteriormente o pCAMBIA-CHLORO-6His-Pg foi digerido com a enzima de restrição *Nco*I onde o gene da *green fluorescent protein* (GFP) foi clonado. O gene GFP foi amplificado por PCR com os oligos iniciador e terminador contendo, ambos como extensão o sítio de restrição da enzima *Nco*I. Os fragmentos amplificados foram ligados ao pGEMT-easy (Promega) e eletroporados em *E. coli* XL1-Blue. Os clones positivos contendo a GFP foram digeridos com *Nco*I, purificados e clonados no vetor pCAMBIA-CHLORO-6His-Pg, já digerido, formando o pCAMBIA-CHLORO-GFP-6His-Pg (Figura 11b). Os vetores formados foram transformados em *Agrobacterium tumefaciens*, linhagem EHA 105 e plaqueados em meio LB sólido contendo rifampicina ($100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) e canamicina ($100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) e crescidos a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h. As digestões foram confirmadas em gel de agarose 0,8 %.

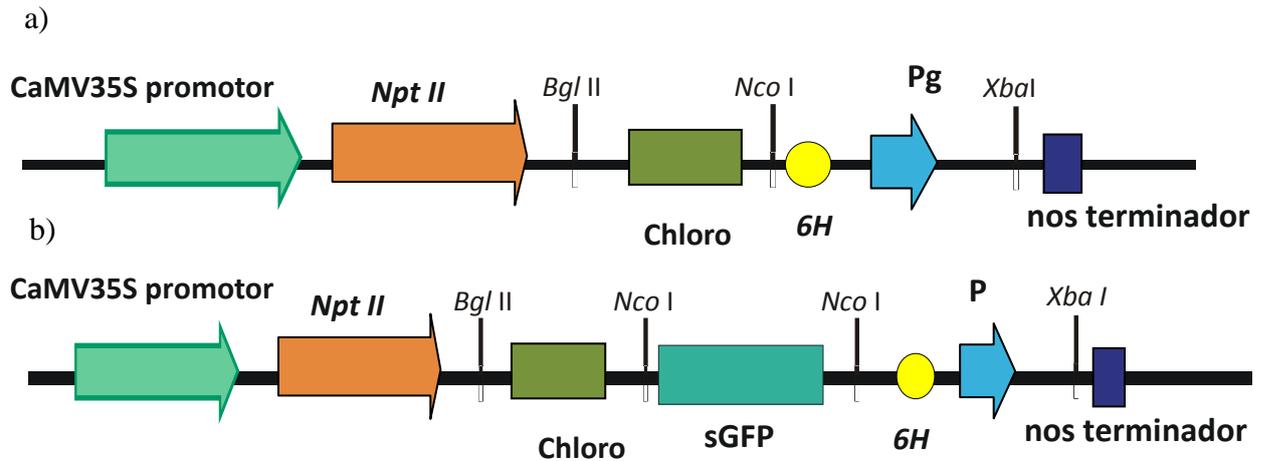


Figura 11. Cassetes de expressão do vetor binário pCambia. (a) pCAMBIA-CHLORO-6His-Pg: fragmento CHLORO-6His-Pg clonado nos sítios *Bgl*III e *Xba*I do vetor pCambia2300. A construção está sob o controle do promotor CaMV35S e tem como marca de seleção o gene *Npt*II que codifica para a resistência da canamicina. O vetor contém um sítio de *Nco*I disponível para inserção da sGFP; (b) pCAMBIA-CHLORO-GFP-6His-Pg: construção originada a partir da clonagem da GFP previsivelmente amplificada por PCR no sítio de *Nco*I de (a).

5.3.3 Construção do vetor de expressão, utilizando o vetor binário pk7GWF2

O vetor pBSK-K-6His-Pg-KDEL (Figura 5), sem os peptídeos sinais, foi digerido com as enzimas de restrição *Sal*I e *Spe*I e o fragmento liberado (6His-Pg) foi clonado no vetor pENTRY11, previamente digerido com as enzimas *Sal*I e *Xba*I, formando o pENTRY11-6His-Pg. O vetor pENTRY11-6His-Pg foi digerido com a enzima de restrição *Nco*I onde o gene da nucleoproteína (N) foi clonado. O gene da proteína N foi amplificado por PCR com os oligos iniciador e terminador contendo como extensão o sítio de restrição da enzima *Nco*I nas porções N-terminal e C-terminal. Os fragmentos amplificados foram ligados ao pGEMT-easy (Promega) e o vetor foi eletroporado em *E. coli* XL1-Blue. Os clones positivos contendo o gene N foram digeridos com *Nco*I, purificados e clonados no vetor pENTRY11-6His-Pg já digerido com as enzimas *Sal*I e *Xba*I, formando o pENTRY11-N-6His-Pg. Para a expressão da proteína o processo de recombinação via Gateway® dos pENTRY11-6His-Pg e vetores pENTRY11-N-6His-Pg, com o vetor binário pK7GWF2 que contém a *green fluorescent protein* (GFP) foi realizado formando os vetores pK7GWF2-GFP-6His-Pg (Figura 12a) e pK7GWF2-GFP-N-6His-Pg (Figura 12b). O vetor binário foi transformado em *Agrobacterium tumefaciens*, linhagem EHA 105, por eletroporação, plaqueado em meio LB sólido contendo spectinomicina ($50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e rifampicina ($100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e crescido a 28°C por 48 h.

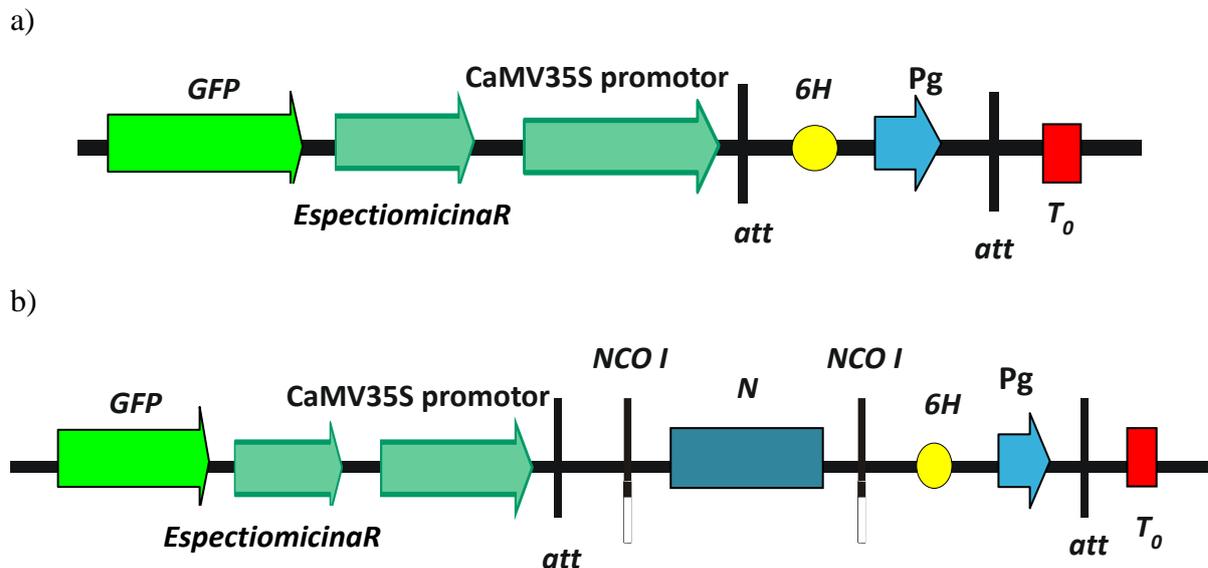


Figura 12. Cassetes de expressão do vetor binário pK7GWF2. (a) A construção contém a GFP na porção N-terminal do His-tag. O His-tag e o Pg estão localizados entre os sítios de recombinação att. (b) O cassete mostra a proteína N clonada no sítio de *NcoI* localizado na porção C-terminal do sítio de recombinação da borda direita. (a) e (b) estão sob controle do promotor CaMV35S e têm a espectiomicina como marca de seleção.

5.3.4 Expressão transitente em *Nicotiana benthamiana*

Plantas de *Nicotiana benthamiana* com quatro semanas e estágio de quatro folhas foram agroinfiltradas em seu lado abaxial com suspensão bacteriana usando seringa de 5 mL sem agulha. As suspensões bacterianas das cinco culturas contendo cada um dos vetores pCAMBIA-CHLORO-GFP-6His-Pg, pK7GWF2-GFP-6His-Pg, pK7GWF2-GFP-N-6His-Pg, PVX-K-6His-Pg-KDEL e PVX-K-6His-Pg foram obtidas pela centrifugação de 3 mL da cultura de LB crescida por 16 h e ressuspensão das células em 5 mL de Meio Murashige-Skoog (MS) (Murashige e Skoog, 1962) contendo 10 mM de cloreto de magnésio, pH 5,6 e 150 μ M de acetosiringona. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento a 25 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C e fotoperíodo de 12 h. As amostras do pCAMBIA-CHLORO-GFP-6His-Pg, pK7GWF2-GFP-6His-Pg e pK7GWF2-GFP-N-6His-Pg foram coletadas 4 dias após a agroinfiltração enquanto as amostras PVX-K-6His-Pg-KDEL e PVX-K-6His-Pg foram coletadas 4 e 10 dias após a agroinfiltração.

5.3.4.1 Confirmação e análise da expressão heteróloga

As folhas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas com os vetores foram pesadas e maceradas em tampão de lise gelado (tris-HCl 500 mM, NaCl 30 mM, β -mercaptoetanol 1 %, triton X-100 0,1 %) na proporção de 1 grama de folha para 2 ml de tampão. O extrato total foi centrifugado a 12.000 g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi quantificado por Bradford (1976). Cem μ g de proteína total foram precipitados com acetona gelada e o precipitado foi recuperado em 20 μ l de tampão de amostra 1 X (tris-HCl 125 mM; SDS 4 %; β -mercaptoetanol 10 %; glicerol 20 % e azul de bromofenol 0,04 %) e aquecido a 95 °C por 5 min. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS PAGE 15 %) (Laemmli, 1970). Após a corrida do gel deu-se prosseguimento à técnica de *Western Blot* para detecção da expressão do peptídeo recombinante (Burnette, 1981; Harlow e Lane, 1988).

A detecção das proteínas foi feita em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15 % como descrito anteriormente (Laemmli, 1970). O gel foi transferido para uma membrana de PVDF (Immobilon P) sendo que as condições de transferência utilizadas foram de 15 V e 200 mA por 1 h, usando tampão de transferência (tris-base 48 mM; glicina 39 mM; SDS 1,3 mM e metanol 20 %). O bloqueio dos sítios inespecíficos da membrana foi feito em solução a 3 % de BSA por 1 h sob agitação. Após o bloqueio, a membrana foi incubada em solução de 1 % de BSA contendo os anticorpos específicos para cada construção. Para as construções PVX-6His-Pg, PVX-K-6His-Pg-Kdel e pCAMBIA-CHLORO-6His-Pg as membranas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-His conjugado com fosfatase alcalina (1:4000; Sigma); para as construções pk7GWF2-GFP-6His-Pg e pCAMBIA-CHLORO-GFP-6His-Pg, as membranas foram incubadas em anticorpo policlonal anti-GFP conjugado com fosfatase alcalina (1:5000; Invitrogen). A construção pk7GWF2-GFP-N-6His-Pg foi incubada com o anticorpo policlonal primário anti-N (1:1000) e com o anticorpo policlonal secundário anti-*rabbit* (1:5000; Invitrogen) conjugado com fosfatase alcalina. Esta mesma construção foi incubada em anticorpo policlonal anti-GFP conjugado com fosfatase alcalina (1:5000; Invitrogen). Todas as membranas foram colocadas sob agitação por 1 h. A revelação foi feita em solução de NBT/BCIP (ROCHE) incubando-se a membrana em 10 ml de tampão de revelação (tris-HCl 0,1 M, pH 9,5, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 0,05 M) que continha diluído 200 μ l da solução estoque (Burnette, 1981; Harlow e Lane, 1988).

5.3.4.2 Purificação do Pg-AMP1 recombinante de *N. benthamiana* – pK7GWF2-GFP-N-6His-Pg.

Folhas agroinfiltradas de *N. benthamiana* foram coletadas 4 dias após a inoculação e maceradas em gral e pistilo com tampão lise na razão de 1:2 de peso das folhas por ml de tampão (Tris-HCl 500 mM, NaCl 30 mM, β -mercaptoetanol 1 %, Triton X-100 0,1 %). O extrato foi centrifugado a 12.000 g por 10 min e o precipitado recuperado no mesmo tampão. 1 % de Nonidet P-40 foi adicionado ao extrato, que foi mantido sob agitação por 1 h a 4 °C, filtrado em membrana de nylon de 11 μ m (Millipore) e armazenado em um tubo de 15ml. 20 % de sucrose foram cuidadosamente adicionados ao tubo e este foi centrifugado a 12.000 g por 10 min. O precipitado e a fração de sucrose foram transferidos para um tubo de microcentrífuga e centrifugados a 12.000 g por 5 min. O precipitado foi recuperado em tampão fosfato e quantificado por Bradford (1976). Depois de quantificadas, 100 μ g de proteína foram precipitadas com acetona e o precipitado recuperado em PBS 1 X. O extrato foi submetido a diversos tratamentos para aumentar a solubilidade da fusão visto que, após a centrifugação, a fusão está presente no precipitado e não no sobrenadante. O aumento da solubilidade irá propiciar um processo de purificação do peptídeo da fusão mais eficiente. Para tanto, o extrato insolúvel, contendo a fusão, foi submetido a diversos tratamentos com o objetivo de verificar qual estratégia levaria a um aumento da solubilidade. Para tanto, fez-se uma triagem utilizando reagentes e condições físicas já descritos na literatura para desnaturação de proteínas. Após a aplicação do tratamento que consistiu em submeter o extrato a (1) diferentes temperaturas por 5 min, (2) formaldeído PA, (3) DTT 1 M, (4) uréia 6 M e (5) guanidina 1 M, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante e o precipitado foram separados. Tampão de amostra foi adicionado à concentração final 1 X nas frações solúvel e insolúvel e aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15 %). Após a corrida do gel deu-se prosseguimento à técnica de Western-blot para detecção da expressão do peptídeo recombinante (Burnette, 1981; Harlow e Lane, 1988). As frações solúveis e insolúveis foram comparadas à amostra não tratada.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CLONAGEM E EXPRESSÃO DO PG-AMP1 NO VETOR pQE30

6.1.2 Transformação genética e extração de DNA plasmidial

A ligação do fragmento Pg-AMP1 ao vetor pQE30 foi confirmada por PCR usando os oligos iniciador e terminador do pQE30. A presença de uma banda de 465 pb, demonstrando o tamanho do inserto, foi visualizada em gel de agarose 1 % (Figura 13).

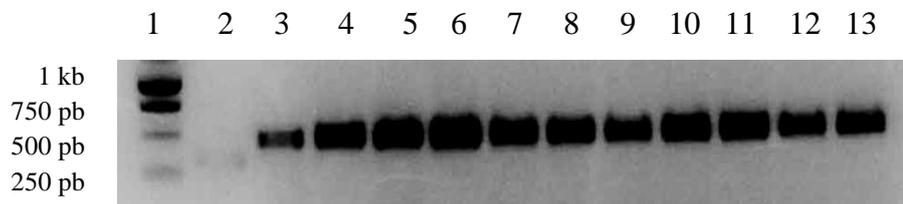


Figura 13. Gel de agarose 1% confirmando a clonagem do inserto no vetor pQE30. Linha1 – Marcador Kb ladder; Linha 2 – Controle positivo do vetor pQE com tamanho aproximado de 300 pb; Linhas 3 a 13 – colônias positivas para o inserto (465 pb) visualizadas pela diferença de tamanho em relação ao controle positivo.

Após a confirmação da presença do inserto no vetor, procedeu-se à extração do DNA plasmidial por meio da técnica de mini preparação (Sambrook e Russell, 2001) e à transformação do pQE30-6H-Pg em *E. coli*, linhagem M15. Esta linhagem foi escolhida por ser própria para a expressão de proteínas recombinantes clonadas no vetor pQE30.

6.1.3 Expressão e confirmação da expressão do peptídeo recombinante

Duas colônias crescidas das células de *E.coli* linhagem M15 transformadas foram inoculadas em meio LB contendo ampicilina contendo $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 16 h, a 37°C e 180 rpm. Depois de crescidas, uma alíquota de $400 \mu\text{L}$ de cada cultura foi reinocula em 20 mL de meio LB contendo o mesmo antibiótico. Acompanhou-se o crescimento bacteriano por meio da medida da densidade ótica (OD_{600}) até que a mesma atingisse o valor entre 0,6 e 0,8 para que se desse início ao procedimento de indução. O acompanhamento do valor da OD é importante para que a indução seja realizada no início da fase *log* de crescimento da bactéria favorecendo o aumento da expressão da proteína recombinante. Após atingir o valor da OD_{600} , retirou-se uma alíquota de 1,5 mL (amostra T_0) e procedeu-se ao processo de indução

pela adição de IPTG ao restante do inóculo na concentração final de 1 mM. Após a adição do agente indutor, alíquotas de 1,5 mL do inóculo induzido foram retiradas de hora em hora até completar 4h de indução (T₁, T₂, T₃ e T₄). As amostras coletadas foram aplicadas em gel de poliacrilamida 15 %.

Para confirmar a expressão do Pg-AMP1, procedeu-se a transferência do gel para a membrana de PVDF e posterior bloqueio dos sítios inespecíficos da membrana e incubação com anticorpo monoclonal anti-His diluído 5000 vezes. Entretanto, somente o controle positivo expressando a proteína GFP em tamanho compatível ao número de resíduos de aminoácidos em sua estrutura, ou seja, 27 kDa. As demais amostras não mostraram bandas de marcação correspondendo à expressão do peptídeo recombinante (dados não mostrados).

Apesar de estudos demonstrarem que a adaptação do *códon usage* não está correlacionada ao nível de expressão da proteína recombinante (Kudla *et al.*, 2009), a sequência de nucleotídeos deduzida a partir de aminoácidos do peptídeo foi otimizada para *códon* preferencial de *Escherichia coli* com a retirada de qualquer códon cuja utilização preferencial pela bactéria seja menor do que 15%, exceto para posições que modifiquem a estrutura secundária evitando a formação de pregas e *loops* na sequência nucleotídica. Peng e colaboradores (2004) demonstraram que a otimização do *códon usage* da defensina recombinante hBD2 resultou em um aumento de nove vezes na expressão quando comparada à expressão da defensina selvagem.

O vetor pQE30-6His-Pg foi eletroporado em outras linhagens de *E. coli* após os resultados negativos de sua expressão na linhagem M15. A linhagem BL21 Star possui uma mutação no alelo *rne131* que atenua a atividade da endonuclease RNaseE que cataliza a clivagem de transcritos em *E. coli* possibilitando a geração de altos níveis de expressão (Lopez *et al.*, 1999; Makino *et al.*, 2011). A linhagem BL21 (DE3) pLys S tem sido usada para expressão de proteínas que estão sob o controle do promotor T7 e apresenta um sítio de ligação ao ribossomo. O plasmídeo pLysS carrega o gene condificante da T7 lisozima que diminui o background durante a expressão de genes sob controle do promotor T7. As condições para expressão do plasmídeo pQE30-6His-Pg nas linhagens BL21 Star e BL21 (DE3) pLysS foram as mesmas aplicadas à linhagem M15. Entretanto, conforme ocorreu na linhagem M15, não foi possível visualizar a expressão do peptídeo recombinante pelas linhagens de *E. coli* BL21 Star e BL21 (DE3) pLysS (dados não mostrados). A escolha de linhagens específicas compreende uma das estratégias para o aumento da expressão de proteínas em *E. coli*, seja pelo aumento da solubilidade, diminuição da degradação enzimática ou pelo dobramento adequado da proteína expressa (Makino *et al.*, 2011). Outras estratégias como a diminuição da temperatura de

indução ou redução da concentração do indutor IPTG também estão documentadas para otimizar do nível de expressão, sendo que nestes casos, a proteína é expressa, mas em quantidade insatisfatória. O emprego de proteínas parceiras surge como alternativa na expressão de peptídeos com atividade antimicrobiana para diminuir a toxicidade à célula hospedeira ou evitar a degradação enzimática por proteases (Li, 2011b).

Tavares e colaboradores (2012) expressaram este mesmo peptídeo (Pg-AMP1) em sistema procarioto utilizando a mesma linhagem de *E. coli* usada neste trabalho, a BL21 (DE3) plysS. Entretanto, os autores conseguiram expressar o peptídeo contendo uma cauda de polihistidina fusionada à porção C-terminal do Pg-AMP1 e uma metionina na porção N-terminal, sem a adição de nenhuma outra proteína estabilizadora. Diferente do trabalho de Tavares e colaboradores, a cauda de polihistidina empregada neste trabalho está clonada na porção N-terminal e possivelmente pode ter interferido no processo de expressão utilizando o vetor pQE30. Outra diferença encontrada foi o vetor de clonagem, pois no trabalho de Tavares o peptídeo foi expresso utilizando o vetor pBSK, sob controle do promotor T7/*lac* polimerase, enquanto neste trabalho foi usado o vetor pQE30, sob controle do promotor T7. Os bioensaios realizados para avaliar a atividade do peptídeo recombinante de Tavares e colaboradores (2012) mostraram um espectro de atividade antimicrobiana diferente em relação ao peptídeo natural extraído da semente da goiaba (Pelegriani *et al.*, 2008). Porto e colaboradores (2014) discutem as possíveis diferenças estruturais que podem ter influenciado na atividade do peptídeo como, por exemplo, o aumento da carga positiva da molécula. Entretanto, estes mesmo autores encontraram que a cauda de polihistidina adicionada à porção C-terminal do peptídeo não alterou a sua estrutura tridimensional (Porto *et al.*, 2014). Após a purificação do Pg-AMP1 por cromatografia de afinidade em coluna de níquel, Tavares e colaboradores (2012) encontraram um peptídeo com massa molecular de 14,2 kDa, em sua forma dimérica. Entretanto, o gene sintético continha 168 pb, inclusos a cauda de polihistidina, metionina e sítios de restrição adicionados, perfazendo 6.983 kDa, enquanto o peptídeo natural isolado continha uma massa molecular de 6029.34 Da (Pelegriani *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos mostram que a proteína recombinante Pg-AMP1 não foi expressa quando utilizado o vetor pQE30 como sistema de clonagem e expressão. Desta maneira, atentou-se para a estratégia de fusionar a molécula de interesse a uma proteína estabilizadora. Entretanto, vale ressaltar, que esta estratégia foi desenhada antes da publicação de Tavares e colegas (2012). Rao e colaboradores (2004) citam como alternativa aos problemas apresentados na expressão de pequenos peptídeos em bactérias, o uso de “proteínas

parceiras” com propriedades aniônicas com o objetivo de evitar a toxicidade dessas substâncias às células hospedeiras. Dessa forma, as proteínas parceiras com características aniônicas neutralizam a carga positiva dos peptídeos, permitindo a expressão eficiente da proteína de interesse. Visando evitar o efeito tóxico de peptídeos antimicrobianos à bactéria hospedeira e encontrar uma eficiente estratégia de purificação, os autores definiram algumas características que a molécula/proteína parceira deve possuir: (1) tamanho de 3 a 4 vezes maior que a proteína de interesse para permitir uma melhor separação do gene; (2) o ponto isoelétrico deve diferir em pelo menos duas unidades do ponto do peptídeo em estudo; (3) característica hidrofílica; (4) deve possuir um único sítio químico ou protease para a remoção da molécula e (5) não deve ser nociva à bactéria.

Um exemplo que mostra o uso de *tags* para expressar peptídeos, é o caso da expressão do peptídeo antimicrobiano LL-37. A fusão do peptídeo à proteína parceira foi realizada para evitar a toxicidade do mesmo à célula hospedeira e alcançar o rendimento necessário para o desenvolvimento dos estudos de RMN (Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007a). Este peptídeo é uma catelicidina humana produzida por diversas células do sistema imunológico, sendo secretado na injúria tecidual, suor e superfícies das vias aéreas. Também há a possibilidade dessa molécula prover um ambiente estéril para a fertilização devido à sua abundância no plasma seminal. O LL-37 foi clonado e expresso em *E. coli* fusionado à tierodoxina (Trx) para estudos de elucidação da estrutura terciária por ressonância magnética nuclear (RMN). (Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007a). Este mesmo grupo usou a Trx como proteína parceira para expressar proteinases humanas derivadas do LL-37. SK-29, KR-20, LL-29, and LL-23 foram clonados, expressos e purificados para compreensão da relação estrutura-função com o LL-37, visto que essas moléculas apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus*, indicando um importante papel regulador na defesa humana (Li *et al.*, 2007b).

A produção da heparinase (HepA) recombinante em *E coli* apresenta baixo rendimento de pureza e insolubilidade. Esta molécula é uma heparina de baixo peso molecular e vem se mostrando como uma promissora molécula para uso clínico quando comparada à heparina por apresentar um menor risco de hemorragia e trombocitopenia. Heparinas de baixo peso molecular também apresentam alta biodisponibilidade devido ao seu longo tempo de meia-vida e reduzida ligação às proteínas plasmáticas. Huang e colaboradores (2012) fusionaram HepA ao *translation initiation factor 2 domain 1* (IF2), à GST, à proteína de ligação a maltose (MBP), à *small ubiquitin modifying protein* (SUMO) e à *N-utilization substance A* (NusA) visando melhorar a solubilidade da HepA recombinante in *E coli*. Todas as fusões apresentaram aumento na solubilidade de HepA quando comparadas à construção contendo

somente *His-tag* no N-terminal (6His-HepA). Outro exemplo de peptídeo expresso fusionado é a alunasina que pode ser encontrado em plantas como soja, trigo e cevada. Estudos sobre esta molécula reportaram sua atividade com atividade quimio-preventiva e em modelos de câncer de pele em camundongos através da supressão da carcinogênese. Este peptídeo foi clonado e expresso fusionado à proteína de domínio de ligação à celulose (CBD) com o objetivo de reduzir a sua toxicidade à célula hospedeira. A expressão em *E. coli* BL 21 (DE3) Star alcançou um rendimento de 3.35g.l^{-1} da proteína fusionada (Kyle *et al.*, 2012).

6.2 EXPRESSÃO DO PG-AMP1 EM SISTEMA PROCARIOTO UTILIZANDO O SISTEMA *GATEWAY*[®]

6.2.1 Construção do vetor de expressão

O gene sintético construído foi inserido em um vetor comercial resultando no vetor nominado PBSK-6His-Pg-KDEL que possui propriedades que possibilitam a expressão em diferentes sistemas devido à presença dos sítios de recombinação *attL1* e *attL2* (Hartley *et al.*, 2000; Bernaudat *et al.*, 2011). Estas propriedades do bacteriófago lambda permitem clonagens por recombinação sítio-específica (Hartley *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2012). Posteriormente, por meio da técnica de recombinação por Gateway[®] obteve-se o vetor pDNOR207-K-6His-Pg-KDEL.

Este mesmo vetor foi utilizado para expressão em sistema heterólogo procarioto, entretanto para tal, foi necessário a retirada dos peptídeos sinais Kappa e KDEL (Figura 9) para que futuramente estes não viessem interferir na expressão por este sistema, além de não serem necessários na expressão em sistema procarioto. . Devido ao pequeno tamanho dos peptídeos sinais não é possível notar a diferença de tamanho quando se visualiza a digestão em gel de agarose 1 %. A confirmação da retirada dos peptídeos foi feita pela repetição da reação de digestão com as mesmas enzimas utilizadas para a retirada dos fragmentos, comparando o vetor digerido ao não digerido (dados não mostrados). Após confirmar o clone sem os peptídeos sinais, este foi recombinado ao vetor pDEST15-GST resultando no vetor de expressão pDEST15-GST-6His-Pg (Figura 8).

6.2.2 Expressão e confirmação da expressão heteróloga em *Escherichia coli*

A partir da reação de recombinação que resultou no pDEST15-GST-6His-Pg transformou-se o vetor de expressão em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Esta linhagem foi escolhida por ser própria para expressar proteínas que podem ser tóxicas à célula hospedeira a partir da alta expressão da lisozima. Esta reduz a expressão basal de genes pela inibição da T7 RNA polimerase (Makino *et al.*, 2011). Depois de transformadas, as células foram incubadas a 37 °C, por 16 h e 180 rpm. Os clones originados por recombinação dispensam a confirmação do inserto devido à mudança na marca de seleção. Os clones não recombinados também apresentam o gene *ccdB* que é tóxico para a célula hospedeira. A expressão do Pg-AMP1 foi confirmada pela indução de 20 ml da cultura. Confirmou-se a presença em estudo piloto de indução tomando alíquotas de 1,5 ml do inóculo antes da indução (T₀) e após duas (T₂) e quatro horas de indução (T₄). Alíquotas de 20 µL foram aplicadas em gel de poliacrilamida 15 % e depois se procedeu à confirmação da expressão por Western-blot (Figura 14). As condições de corrida, transferência, bloqueio e incubação com anticorpo foram as mesmas aplicadas para a construção pQE30-6His-Pg.

A partir da revelação do *Western-blot* (Figura 14), observou-se a expressão do peptídeo Pg-AMP1 por intermédio do vetor pDEST15 na linhagem BL21 (DE3) pLysS. O controle negativo, célula de *E. coli*, linhagem BL21 (DE3) pLysS não transformada, como esperado, não revelou a banda de 33 Kda referente a proteína heteróloga expressa. O controle positivo foi necessário para permitir a comparação entre o tamanho da GFP (27 kDa) e a fusão da GST (27 kDa) com o Pg-AMP1 (6 kDa) fusionado perfazendo 33 kDa. A diferença de tamanho entre o controle positivo e o peptídeo fusionado foi visualizada na membrana de PVDF por meio da técnica de *Western-blot*, que mostrou tamanho compatível ao esperado após a fusão do peptídeo com a GST. A amostra não induzida não apresentou expressão basal visível, enquanto as amostras T₂ e T₄ mostraram um aumento gradual na expressão do peptídeo (Figura 14).

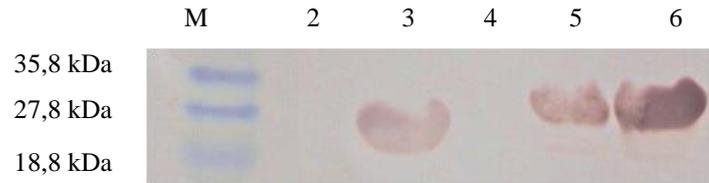


Figura 14. Membrana de PVDF expressão de proteína recombinante com o vetor pDEST15-GST-Pg em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS com anticorpo anti-His. Linha M - Marcador SDS-PAGE Low Range (BIO-RAD); Linha 2 - Controle negativo BL21 (DE3) pLysS não transformada. Linha 3 - Controle positivo GFP; Linha 4 – amostra T₀ não induzida. Linha 5 - amostra T₂ após duas hora de indução. Linha 6 - amostra T₄ após quatro horas de indução.

O ensaio de solubilidade do peptídeo permitiu verificar se a proteína foi expressa em sua forma solúvel ou na forma de corpos de inclusão. Após a indução do vetor em tempos determinados, o peptídeo recombinante foi expresso em ambas as formas, sendo que os tempos de indução de 2 h, 3 h e 4 h não apresentaram diferença considerável na quantidade de proteína expressa (dados não mostrados). Assim, optou-se pelo tempo de duas horas para expressão e posterior purificação do peptídeo recombinante.

O processo de produção de proteínas recombinantes permite, através da consolidação da engenharia genética, viabilizar a síntese de produtos complexos que não são facilmente obtidos por processos convencionais. Entretanto, como dito anteriormente, a expressão de peptídeos antimicrobianos em *E.coli* apresenta algumas dificuldades como a sua toxicidade à célula hospedeira e ao seu pequeno tamanho e natureza catiônica tornando-os altamente susceptíveis à degradação proteolítica (Li, 2011a). A fusão desses peptídeos a proteínas estabilizadoras está bem fundamentada na literatura. Estas moléculas protegem os peptídeos durante o processo de biossíntese por desempenharem um papel similar a precursores inativos (Li, 2009).

A expressão do peptídeo Pg-AMP1 só foi possível após a sua fusão à proteína estabilizadora. A GST tem sido considerada uma das proteínas mais comumente usadas para expressão de peptídeos antimicrobianos. Ela permite a expressão de peptídeos em sua forma solúvel e pode ser purificada facilmente por cromatografia de afinidade (Li, 2009). Também os peptídeos antimicrobianos puroindolina A e puroindolina B, isolados da semente do trigo, foram expressos fusionados à GST visando o aumento da solubilidade da proteína expressa (Capparelli *et al.*, 2007).

A primeira defensina caracterizada e isolada da uva (*Vitis vinifera*) foi o peptídeo antimicrobiano Vv-AMP1. Este peptídeo é expresso naturalmente após os primeiros sinais de amadurecimento do fruto. O Vv-AMP1 foi fusionado à GST e super-expresso em *E. coli*

linhagem *Rosetta gami* pLysS alcançando 5 mg.l⁻¹. Depois de clivado e purificado por cromatografia de troca iônica, a atividade do peptídeo recombinante foi avaliada contra fungos patogênicos a plantas, sendo que em todos os fungos houve diminuição no acúmulo de biomassa dos isolados testados (de Beer e Vivier, 2008). Igualmente, o peptídeo antimicrobiano palustrin-2CE, isolado da espécie de sapo *Ranachensinensis*, foi fusionado e expresso em *E. coli* linhagem BL21 (DE3) pLysS. Entretanto, a atividade antimicrobiana do peptídeo recombinante foi inferior à atividade do peptídeo sintético (Su *et al.*, 2012).

6.2.3 Isolamento do peptídeo recombinante

O isolamento do peptídeo do extrato total da cultura bacteriana crescida por 2 h em meio LB, foi realizada por cromatografia de afinidade na coluna GStrapp da GE. Após a extração do peptídeo recombinante obtido a partir da indução de 1L da cultura em meio LB por IPTG (1 mM), o peptídeo foi dialisado por 24 h e filtrado em membrana de 45 µm. Primeiramente, a coluna GStrapp de 1 ml foi equilibrada com 10 ml tampão de ligação e depois o extrato contendo o peptídeo foi aplicado na coluna. A coluna foi novamente lavada com 10 ml de tampão de ligação e o peptídeo foi eluído em 15 ml de tampão de eluição. Amostras da cultura induzida por 2 h, da fração solúvel, do extrato aplicado na coluna e do tampão de eluição foram quantificadas por Bradford (1976) sendo que 100 µg de proteína total de cada fração foram precipitadas em acetona e depois recuperadas em tampão de amostra 1 X para confirmação da purificação em SDS-PAGE 15 %. O peptídeo fusionado foi purificado conforme mostrado na Figura 15 já que o mesmo foi visualizado somente na fração do peptídeo eluído, não ocorrendo perdas para a fração do lisado aplicado na coluna.

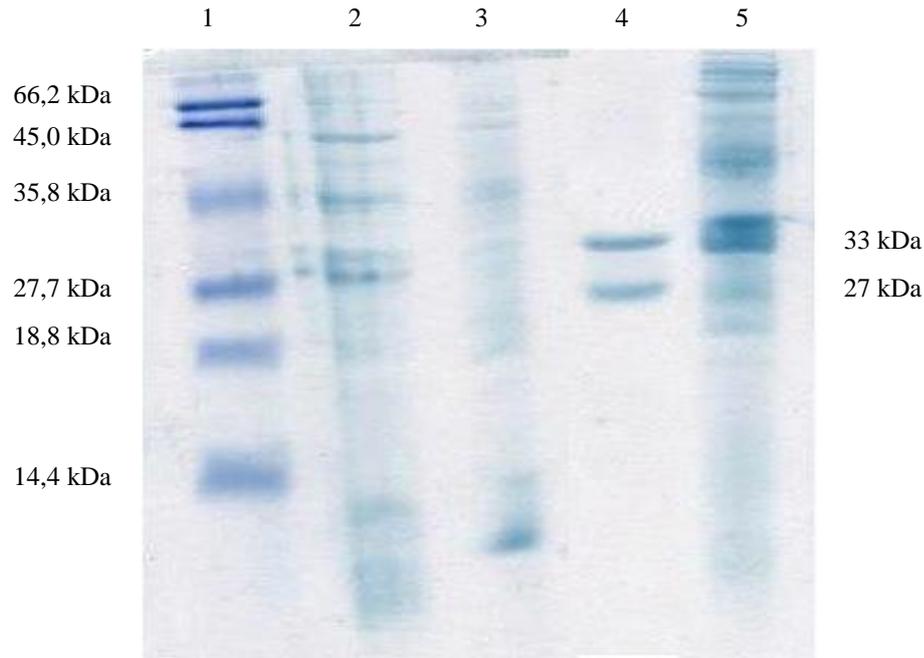


Figura 15. SDS-PAGE 15 % corado em *coomassie* mostrando o processo de purificação do Pg-AMP1. utilizando coluna de afinidade Linha 1: marcador Low Range (Biorad); Linha 2: Extrato total da cultura induzida por 2 h; Linha 3: Lisado do peptídeo recombinante aplicado na coluna; Linha 4: Fração do peptídeo purificado no tampão de eluição; Linha 5: Fração solúvel do peptídeo recombinante.

Outro detalhe que merece atenção na Figura 15 está na linha 4, na qual duas bandas aparecem destacadas, uma de aproximadamente 33 kDa e outra de 27 kDa. A banda de 33 kDa corresponde ao tamanho do Pg-AMP1 fusionado à GST, enquanto a banda de 27 kDa corresponde somente à GST. Moon e colaboradores (2006) encontraram resultados semelhantes após a indução do peptídeo antimicrobiano LL-37 fusionado à GST em *E. coli* BL21 (DE3). Os autores atribuíram à presença da banda correspondente ao tamanho da GST a uma possível clivagem intracelular da proteína de fusão ou à interrupção da tradução. Uma possível desnaturação ou quebra da proteína de fusão também podem ter ocorrido devido à excessiva sonicação durante o preparo do lisado celular.

6.2.4 Bioensaios contra bactérias patogênicas

A atividade do peptídeo recombinante fusionado à GST foi testada contra as bactérias patogênicas *Proteus mirabilis* (ATCC 3065), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Na realização do bioensaio, a GST foi diluída nas mesmas concentrações do peptídeo para avaliar se a proteína iria interferir na atividade do mesmo. Os resultados mostraram atividade tanto da proteína de

fusão (GST livre) quanto do peptídeo fusionado (Tabela 5). Entretanto, ambos apresentaram baixa porcentagem de inibição no crescimento das bactérias testadas (dados não mostrados). Dessa forma, sugere-se que a falta de atividade do peptídeo fusionado possa ser devido à interferência da GST na atividade antimicrobiana do peptídeo, por exemplo, ocultando os sítios ativos da molécula. Assim, a baixa atividade encontrada do peptídeo recombinante fusionado à GST e a atividade da própria GST, inviabilizam o uso do peptídeo recombinante fusionado para a produção de nanopartículas como sistema de liberação controlada.

Tabela 5. Atividade do Pg-AMP1 recombinante e da GST isolada.

Microrganismo	Atividade GST (% de inibição)	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Atividade GST-Pg-AMP1	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>E. coli</i> ATCC 8739	21 %	512	15 %	512
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	6.8 %	512	3.5 %	512
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	6 %	512	17 %	512
<i>P. mirabilis</i> ATCC 3065	ND	ND	ND	ND

ND: não detectado.

6.3 EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *NICOTIANA BENTHAMIANA* UTILIZANDO O SISTEMA DE GATEWAY®

6.3.1 Expressão e confirmação da expressão em *N. benthamiana*

O vetor de clonagem pDONR207-K-6His-Pg-KDEL originado a partir da recombinação entre o vetor PBSK-CHLORO-K-6His-Pg-KDEL e o pDNOR207, foi então preparado para a obtenção de diferentes vetores de expressão, conforme demonstrado na Figura 9: (1) o próprio pDONR207-K-6His-Pg-KDEL sem passar por nenhuma digestão foi recombinado ao vetor viral PVX formando o PVX-K-6His-Pg-KDEL (Figura 10a) para expressão do peptídeo no retículo endoplasmático; e (2) o pDONR207-K-6His-Pg-KDEL foi digerido com as enzimas de restrição *NcoI* (Figura 9) para a retirada do peptídeo sinal KAPPA de direcionamento da proteína para o retículo endoplasmático, e depois digerido com as enzimas de restrição *XbaI* e *SpeI* para a retirada do peptídeo sinal KDEL de retenção do peptídeo no retículo endoplasmático. Depois de confirmadas as retiradas dos peptídeos sinais, o vetor pDONR207-6His-Pg foi recombinado ao PVX formando o PVX-6His-Pg (Figura 10b) para a expressão do Pg-AMP1 no citoplasma da célula.

Os vetores de expressão pCAMBIA-CHLORO-6His-Pg (Figura 11a) e pCAMBIA-CHLORO-GFP-6His-Pg (Figura 11b) originaram da subclonagem do fragmento CHLORO-6His-Pg. O fragmento CHLORO-6His-Pg foi purificado a partir da digestão do vetor PBSK-CHLORO-6His-Pg, sem os peptídeos sinais KAPPA e KDEL, com as enzimas *Bgl*III e *Xba*. O fragmento foi ligado ao vetor pCAMBIA previamente digerido com as enzimas *Bgl*III e *Spe*I. Depois de formado o vetor pCAMBIA-CHLORO-6His-Pg foi digerido com a enzima de restrição *Nco*I para a clonagem do gene na GFP, anteriormente amplificado por PCR.

O sistema de expressão transgênica em cloroplasto tem sido comumente usado para proteínas que não necessitam de complexas modificações pós-traducionais como é o caso do Pg-AMP1. Devido ao grande número de cloroplastos em uma única célula, várias cópias do transgene são inseridas, além de não ocorrer silenciamento gênico e de múltiplos genes poderem ser expressos simultaneamente. Este sistema também possibilita o acúmulo da proteína recombinante limitado pela baixa toxicidade da mesma à planta hospedeira (Daniell *et al.*, 2005; Desai *et al.*, 2010; Viana *et al.*, 2012). A proteína do capsídeo do vírus HIV foi expressa nos cloroplastos das folhas de *N. benthamiana* e alcançou um 4,5 % do total de proteína solúvel (TSP) quando comparada à proteína expressa no citoplasma (0,3 %) (Maclean *et al.*, 2007). Em outro trabalho, a proteína lítica do fago *Streptococcus agalactiae*, lisina PlyGBS, foi super expressa em cloroplastos de *N. tabacum* chegando a 70 % de TSP (Oey *et al.*, 2009).

O vetor pENTRY11-6His-Pg foi gerado a partir do vetor PBSK-K-6His-Pg-KDEL. A proteína N, anteriormente amplificada por PCR tendo o sítio de restrição da enzima *Nco*I adicionado às porções N-terminal e C-terminal, foi clonada no sítio da enzima de restrição *Nco*I formando o vetor pENTRY11-6His-Pg, e a clonagem foi confirmada por PCR usando oligos iniciador e terminador da própria proteína N gerando um fragmento de 750 pb (Figura 16).

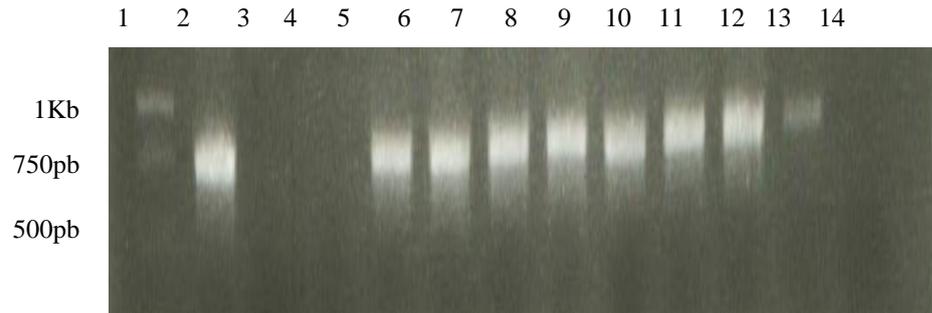


Figura 16. Gel de agarose 1 % com amplificação do gene da proteína N por PCR usando os oligos iniciador e terminador da proteína N. Linha 1: marcador de peso molecular kb ladder. Linha 2: controle positivo: proteína N contendo o sítio de *NcoI* nas porções N-terminal e C-terminal. Linhas 3-13: reação de amplificação contendo os clones positivos e negativos. Linha 14: controle negativo: reação de PCR sem DNA.

A orientação do inserto foi confirmada por digestão com as enzimas *PstI* e *EcoRI* sendo que a inserção da proteína N na orientação correta gerou um fragmento de 774 pb (Figura 17).

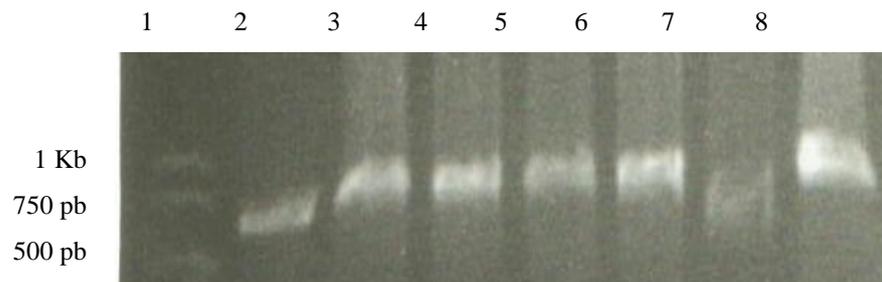


Figura 17. Gel de agarose 1 %. Confirmação da clonagem da proteína N de 750 pb no pENTRY11-6His-Pg. Digestão para confirmação da orientação da clonagem. Os clones na orientação correta têm tamanho de 774 pb, enquanto na orientação incorreta o tamanho é de 707 pb. Linha 1: marcador de peso molecular kb ladder. Linhas 2-8: digestões realizadas com as enzimas *PstI* e *EcoRI*.

Os vetores de expressão em planta pK7GWF2-GFP-6His-Pg (Figura 12a) e pK7GWF2-GFP-N-6His-Pg (Figura 12b) originaram da recombinação entre o vetor pENTRY-11-6His-Pg e pENTRY-11-N-6His-Pg, respectivamente. O vetor pk7GWF2 tem fusionada à sua sequência o gene da *gfp*. A estratégia de expressão do Pg no vetor pk7GWF2 foi desenvolvida a partir (1) da recombinação direta do vetor pENTRY11-6His-Pg com o vetor pk7GWF2 formando o vetor pk7GWF2-GFP-6His-Pg, e (2) da clonagem do gene da nucleoproteína, amplificada por PCR, no sítio da enzima de restrição *NcoI*. Depois de formado o vetor pENTRY11-N-6His-Pg, este foi recombinado ao vetor pk7GWF2, formando o vetor pk7GWF2-GFP-N-6His-Pg (Figura 9).

Os vetores foram transformados por eletroporação em *Agrobacterium tumefaciens* linhagem EHA 105 e plaqueadas em meio LB sólido contendo os antibióticos de seleção conforme o sistema de expressão por 48 h a 28 °C. As construções dos vetores PVX e pCAMBIA têm como marca de seleção a canamicina (100 µg.ml⁻¹) e a linhagem EHA 105 de *A. tumefaciens* tem a rifampicina (100 µg.ml⁻¹). O vetor pK7GWF2 tem como marca de seleção a spectnomicina (5 µg.ml⁻¹). Uma colônia foi inoculada em meio LB líquido contendo os mesmos antibióticos e incubada por 16 h a 28 °C sob agitação. O inóculo crescido foi centrifugado e o precipitado recuperado em suspensão para infiltração. A densidade ótica da suspensão bacteriana foi ajustada com a solução de infiltração até o valor de 0,5. Para melhor eficiência do processo de expressão, o inibidor de silenciamento gênico Hcpro foi adicionado às distintas suspensões bacterianas na proporção 2:1. O Hcpro consiste em um inibidor de silenciamento gênico e auxilia na expressão da proteína de interesse em folhas de plantas (Conley *et al.*, 2011b; Joseph *et al.*, 2012). Conley e colaboradores (2009) reforçam a função destas moléculas quando co-expressaram a fusão GFP-ELP com p19, um inibidor de silenciamento gênico, com a mesma função do Hcpro. Os autores alcançaram níveis de expressão duas vezes maiores em folhas de *N. benthamiana* em relação ao controle sem a presença do p19.

As folhas agroinfiltradas foram coletadas após 4 e 10 dias de expressão das construções do vetor viral PVX. Por se tratar de um vetor viral, a planta continua expressando a proteína por um período aproximado de até 12 dias. A expressão transiente sistêmica ocorre a partir da infecção da planta com vetores virais quando as novas folhas da planta, que não foram infiltradas, apresentam sintomas de contaminação viral. As folhas agroinfiltradas foram coletadas 4 dias após a inoculação, e as folhas expressando o peptídeo sistemicamente coletadas após 10 dias. A expressão transiente em *N. benthamiana* foi escolhida devido ao crescimento rápido e à facilidade para agroinfiltração, apesar da pequena biomassa disponível quando comparada a outras espécies de tabaco (Marillonnet *et al.*, 2005; Conley *et al.*, 2011a).

Igualmente ao sistema procariota de expressão, o peptídeo Pg-AMP1 somente foi expresso em planta após a sua fusão a uma proteína estabilizadora. Não foi observado expressão heteróloga em *N. benthamiana* quando as construções contendo somente o peptídeo e a cauda de histidina fusionada à sua porção N-terminal foram introduzidas em planta, sendo possível visualizar somente o controle positivo de GFP (dados não mostrados).

A introdução dos vetores PVX-6His-Pg e PVX-K-6His-Pg-KDEL em *N. benthamiana* não levaram à expressão do peptídeo após 4 e 10 dias da inoculação. Da mesma forma, o

vetor pCAMBIA-CHLORO-6His-Pg não expressou o peptídeo mesmo esta apresentando direcionamento da expressão para o cloroplasto. A ausência de uma proteína estabilizadora fusionada ao peptídeo Pg-AMP1 pode ter tido consequências na expressão heteróloga deste peptídeo. Alguns fatores podem justificar este resultado, como por exemplo: a instabilidade do próprio peptídeo ou a molécula pode ter sofrido degradação proteolítica. A ligação do peptídeo a uma proteína de fusão pode levar ao acúmulo de proteínas recombinantes em plantas além de colaborar no processo de purificação. (Conley *et al.*, 2009; Conley *et al.*, 2011b). Um exemplo, que pode ser citado, foi o estudo realizado por Torrent e colaboradores (2009) que alcançaram níveis de expressão 100 e 13 vezes maior após fusionar a γ -zein ao fator de crescimento epidermal (EGF) e ao hormônio do crescimento humano (hGH) em tabaco. Em estudo semelhante, o antígeno F1-V foi expresso fusionado à γ -zein em folhas de *N. benthamiana* e obteve um acúmulo cinco vezes maior quando comparado ao F1-V não fusionado (Alvarez *et al.*, 2010).

A estratégia de fusionar o peptídeo a outras proteínas foi realizada após os resultados negativos obtidos com a construção no vetor pQE30 em sistema procariota e em relatos da literatura (Viana *et al.*, 2013). Os resultados confirmam a necessidade da proteína fusionada, pois quando o peptídeo foi fusionado a uma proteína estabilizadora, no caso da presença da GST (utilizada no sistema de expressão procariota) e GFP (em *Nicotiana benthamiana*), o mesmo foi expresso conforme pode ser visto na Figura 18.

Na Figura 18a, pode-se observar a expressão da proteína Pg-AMP1 fusionada a GFP (Figura 18a, linha 3) no vetor Pk7GWF2-GFP-6His-Pg, apresentando um tamanho de aproximadamente 33 kDa. Da mesma forma, após fusionar a GFP à construção pCAMBIA-CHLORO-6His-Pg, o Pg-AMP1 foi expresso fusionado conforme revelou o *Western-blot* ilustrado na Figura 18b.



Figura 18. Membrana de PVDF incubada com anticorpo policlonal anti-GFP (1:5000) e anti-His (1:4000). Linha 1: marcador Low Range (BIO-RAD); (a) extrato total de folhas de *N. benthamiana* infiltradas com *A. tumefaciens* com a construção pK7GWF2-GFP-6His-Pg após 4 dias de inoculação: Linha 1: marcador Low Range (BIO-RAD); Linha 2: Controle positivo GFP; Linha 3: pK7GWF2-GFP-6His-Pg; Linha 4: controle negativo – planta não transformada. (b) extrato total de folhas de *N. benthamiana* infiltradas com *A. tumefaciens* expressando pCAMBIA-CHLORO-GFP-Pg.. Linha 1- Marcador Color Burst (Sigma); Linha 2 - Controle negativo planta não transformada. Linha 3 – pCAMBIA-CHLORO-GFP. Linha 4 – pCAMBIA-CHLORO-GFP-Pg.

Com a revelação da expressão da proteína recombinante, os próximos passos seriam a purificação da mesma utilizando uma coluna de níquel com afinidade pela cauda de polihistidina presente. Entretanto, o *Western-blot* dessas mesmas construções não revelou a fusão quando a membrana foi incubada em anticorpo monoclonal anti-His (dados não mostrados). Acredita-se que o sítio de His-tag não estaria disponível para que a proteína se ligasse à coluna e fosse purificada. Desta maneira, foi traçada uma nova estratégia para purificação da proteína recombinante ligada à outra proteína de fusão.

Dessa forma, a proteína N foi fusionada à construção Pk7GWF2-GFP-6His-Pg formando outra construção denominada Pk7GWF2-GFP-N-6His-Pg (Figura 9). A proteína N é uma das proteínas do nucleocapsídeo do *Tomato spotted wilt vírus* (TSWV). Este nucleocapsídeo é composto pela nucleoproteína e RNA virais, formando partículas conhecidas como ribonucleoproteínas (RNPs). A homopolimerização da proteína N leva à formação de nucleocapsídeos que são extremamente estáveis em células vegetais, além de serem facilmente purificados por ultracentrifugação (Avila *et al.*, 1990; Lacorte *et al.*, 2007). Esta construção foi transformada em *A. tumefaciens* EHA 105 e a suspensão bacteriana foi infiltrada em folhas de *N. benthamiana*. Após 4 dias, as folhas foram coletadas e fez-se a pré-purificação da proteína recombinante fusionada. A Figura 19 mostra o resultado da expressão do peptídeo fusionado às proteínas N e GFP, perfazendo uma banda equivalente a 60 kDa, a partir do extrato insolúvel das folhas agroinfiltradas. Devido às características da proteína N, esta forma agregados insolúveis no interior da folha e a sua purificação é feita por gradiente de sucrose e centrifugação. Folhas de *N. benthamiana* não transformadas foram usadas como controle negativo (linhas 1 e 6), não podendo ser visualizado qualquer sinal de expressão. Nas

linhas 7, 8 e 9 (Figura 19), observam-se bandas com tamanho correspondente à GFP (27 kDa) enquanto nas linhas 2, 3 e 4 verificou-se o aparecimento de bandas inespecíficas com tamanho aproximado de 40 kDa. O aparecimento de bandas inespecíficas pode ter ocorrido devido a utilização de um anticorpo policlonal. Esse tipo de anticorpo, pelo próprio processo de sua fabricação, pode levar ao aparecimento de bandas inespecíficas pois pode ser produzido utilizando vários epítopos de uma mesma proteína. Também, existe a possibilidade de contaminação de outros epítopos durante o processo de produção do anticorpo.



Figura 19. Membrana de PVDF incubada com anticorpo policlonal anti-GFP (1:5000) e anticorpo policlonal anti-N. Extrato insolúvel de folhas de *N. benthamiana* infiltradas com *A. tumefaciens* expressando pK7GWF2-GFP-N-Pg. Linha 1: Controle negativo, planta não transformada; Linha 2: pK7GWF2-GFP-N-Pg-1; Linha 3: pK7GWF2-GFP-N-Pg-2; Linha 4: pK7GWF2-GFP-N-Pg-3; Linha 5: Marcador Color Burst (Sigma); Linha 6: Controle negativo, planta não transformada; Linha 7: pK7GWF2-GFP-N-Pg-1; Linha 8: pK7GWF2-GFP-N-Pg-2; Linha 9: pK7GWF2-GFP-N-Pg-3; Controle positivo GFP. As amostras das linhas de 1 a 4 foram incubadas com anticorpo primário Anti-N e anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina anti-*rabbit*, enquanto as amostras das linhas de 6 a 10 foram incubadas com anticorpo conjugado com fosfatase alcalina anti-GFP.

Para verificar o aumento da solubilidade da fusão GFP:N:Pg, o peptídeo foi recuperado em tampão fosfato a partir do extrato insolúvel e submetido a diferentes tratamentos para verificar qual das estratégias alcançaria maior solubilidade, visto que a fusão GFP:N:Pg está presente no precipitado. A próxima etapa consistiu em submeter 100 µg de proteína total, do extrato foliar, às temperaturas de 50 °C, 75 °C e 100 °C por cinco minutos, ao formaldeído a 10 %, 25 % e 50 %. Após submeter o extrato insolúvel a diferentes tratamentos, o extrato foi centrifugado e separou-se a fração solúvel da insolúvel. A Figura 20 mostra a membrana de PVDF do *Western-blot* contendo as frações solúveis e insolúveis após o tratamento com a temperatura (Figura 20a) e o tratamento com diferentes concentrações de formadeído (Figura 20b). Assim, pode-se observar que em ambos os tratamentos não houve aumento na solubilidade da proteína fusionada.

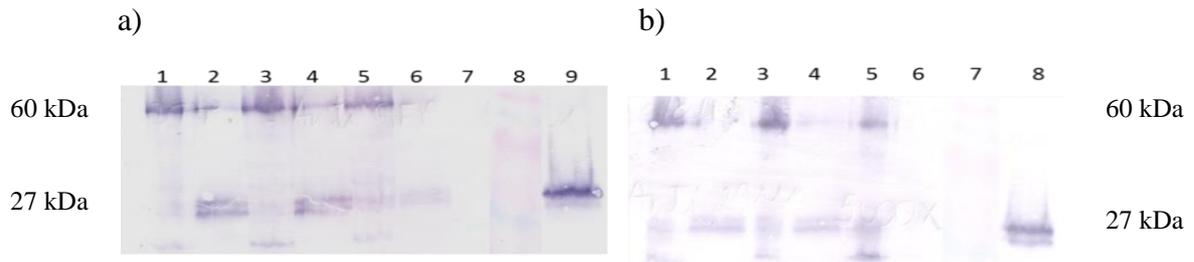


Figura 20. Membrana de PVDF incubada com anticorpo policlonal anti-GFP (1:5000). Extrato insolúvel de folhas de *N. benthamiana* infiltradas com *A. tumefaciens* expressando pK7GWF2-GFP-N-Pg sob diferentes tratamentos. (a) As amostras foram submetidas a diferentes temperaturas, por 5 min, e depois separadas nas frações solúvel e insolúvel; Linha 1: pK7GWF2-GFP-N-Pg 50 °C - insolúvel; Linha 2: pK7GWF2-GFP-N-Pg 50 °C - solúvel; Linha 3: pK7GWF2-GFP-N-Pg 75 °C - insolúvel; Linha 4: pK7GWF2-GFP-N-Pg 75 °C - solúvel; Linha 5: pK7GWF2-GFP-N-Pg 100 °C - insolúvel; Linha 6: pK7GWF2-GFP-N-Pg 100 °C - solúvel; Linha 7: Controle negativo – planta não transformada; Linha 8: Marcador Color Burst (Sigma); Linha 9: Controle positivo GFP. (b) As amostras foram submetidas a diferentes concentrações de formaldeído e depois separadas nas frações solúvel e insolúvel; Linha 1: pK7GWF2-GFP-N-Pg 10 % - insolúvel; Linha 2: pK7GWF2-GFP-N-Pg 10 % - solúvel; Linha 3: pK7GWF2-GFP-N-Pg 25 % - insolúvel; Linha 4: pK7GWF2-GFP-N-Pg 25 % - solúvel; Linha 5: pK7GWF2-GFP-N-Pg 50 % - insolúvel; Linha 6: pK7GWF2-GFP-N-Pg 50 % - solúvel; Linha 7: Marcador Color Burst (Sigma); Linha 8: Controle positivo GFP.

A partir dos resultados encontrados, o uso do Pg-AMP1 recombinante fusionado torna-se inviável para a produção de nanopartículas. Os agregados insolúveis formados pela proteína N podem interferir na atividade do peptídeo, como ocorrido com a GST. A proteína N está bem caracterizada em estudos de virologia do TSWV. Entretanto, a sua aplicação como proteína de fusão ainda é pouco explorada. Lacorte e colaboradores (2007) avaliaram o potencial da proteína N como proteína de fusão. Os autores fusionaram a proteína N às porções N-terminal ou C-terminal da GFP e expressaram a construção em folhas de *N. benthamiana*. O nível de expressão foi avaliado por microscopia de fluorescência e *Western-blot*. Os resultados mostraram que a fusão N:GFP levou a um maior nível de expressão com a formação de agregados no citoplasma da célula em relação a GFP:N. Além disso, as propriedades da proteína N permitiram a aplicação de um rápido e simples método de purificação de proteínas de plantas baseado em uma simples filtração e centrifugação.

7 CONCLUSÃO

Os dados descritos nesse trabalho reforçam a ideia que os peptídeos antimicrobianos compreendem uma nova fronteira no combate às infecções hospitalares como novos agentes antimicrobianos. Para tanto, vários obstáculos ainda precisam ser superados para que essas moléculas cheguem à fase clínica de avaliação e estejam disponíveis comercialmente. Este trabalho se propôs a estudar e avaliar estratégias de expressão heteróloga para produção dessas moléculas em quantidades suficientes para a condução de estudos complementares e desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos. A partir dos resultados encontrados, pode-se concluir que:

- ▶ O peptídeo Pg-AMP1 somente foi expresso em sistema procarioto e eucarioto (*Nicotiana benthamiana*) após a sua ligação às proteínas estabilizadoras GST, GFP e N em ambos os sistemas testados;
- ▶ O uso de proteínas de fusão consiste em uma estratégia viável para a expressão heteróloga de peptídeos antimicrobianos em *Escherichia coli* e *Nicotiana benthamiana* como mostrado usando o Pg-AMP1;
- ▶ A GST pode ter interferido na atividade do Pg-AMP1, visto que este não apresentou atividade. A GST também mostrou uma baixa atividade contra as bactérias testadas;
- ▶ A clivagem das proteínas fusionadas deve ser realizada para que não haja interferência na atividade da molécula expressa.
- ▶ A expressão heteróloga de peptídeos e proteínas é um processo que depende de fatores como a estrutura primária da proteína a ser expressa, dos vetores utilizados, das proteínas de fusão a serem utilizadas de expressão.
- ▶ Não foi possível produzir grandes quantidades de Pg-AMP1 recombinante ativo utilizando as estratégias citadas neste trabalho.

**CAPÍTULO 2 – PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS POR *ELECTROSPINNING*
CONTENDO O PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO CM-P1 COMO SISTEMA DE
LIBERAÇÃO CONTROLADA**

1 INTRODUÇÃO

O quadro de epidemiologia fúngica sistêmica está mudando temporal e geograficamente. Além disso, o número de linhagens multi-resistentes está emergindo, de acordo com estudos de longa duração que utilizam diversas drogas para combater a infecção sistêmica causada por fungos (Mean *et al.*, 2008). Sabendo que os antifúngicos disponíveis não são efetivos para muitos dos quadros de infecções sistêmicas, indústrias farmacêuticas e empresas de biotecnologia vêm sendo estimuladas na busca por novos compostos.

Com o aumento da incidência de doenças como a AIDS/HIV, avanços nas técnicas de transplantes de órgãos, tem-se observado uma elevação no número de pessoas com o sistema imunológico comprometido, o que favorece o aparecimento de novos casos de fungemias. Dentre elas, destacam-se as candidíases, responsáveis por 50% dos casos de doenças fúngicas sistêmicas, podendo chegar a 100% dos casos registrados em países em desenvolvimento (Husain *et al.*, 2003).

As células fúngicas possuem parede celular e que atua como uma barreira de proteção contra o ambiente externo. Tanto fungos leveduriformes como os filamentosos, compartilham semelhanças estruturais em sua parede celular (Bowman e Free, 2006). A complexidade de estruturas formadas por proteínas glicosiladas assim como a diversidade lipídica desse componente estrutural, contribuem para a permeabilidade dessa estrutura na célula fúngica contribuindo em sua porosidade e, conseqüentemente no sucesso de tratamentos que exploram essas características (Zlotnik *et al.*, 1984; Brajtborg *et al.*, 1990; Lupetti *et al.*, 2002).

Dentre os mecanismos de ação propostos para os peptídeos com atividade antifúngica, está a transferência de proteínas lipídicas, a ação da catelicidinas, ceproninas e α -defensinas, a internalização mediada por receptores (defensinas oriundas de plantas), a indução da cascata de sinalização para a produção de espécies reativas de oxigênio e indução da morte celular (Batalia *et al.*, 1996; De Lucca *et al.*, 2000; Mahdavi *et al.*, 2012).

Em meio aos peptídeos com atividade antifúngica estão os derivados de plantas, como as proteínas semelhantes às thaumatinas, as defensinas e as histatinas, os derivados de mamíferos como a lactoferrina bovina e as defensinas de mamíferos. Há também os derivados de insetos, como as temporinas, brevininas e cecropinas. Todos com atividade contra leveduras ou contra as formas filamentosas de fungos (Edgerton *et al.*, 1998; Mandard *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2001; Veerman *et al.*, 2004). Neste contexto, os PAMs surgem como uma nova geração de compostos terapêuticos, os quais demonstram um potencial inovador

relacionado às características peculiares destas moléculas e ao alto potencial antifúngico e imunomodulatório que muitos destes apresentam (Mulder *et al.*, 2013).

A partir da prospecção e isolamento de peptídeos de fontes naturais, o peptídeo antimicrobiano Cm-p1 foi isolado e purificado do molusco marinho *Cenchritis muricatus* (Lopez-Abarrategui *et al.*, 2012a). Neste estudo, a fração semi-purificada do Cm-p1 mostrou atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Em estudos complementares, Cm-p1 foi quimicamente sintetizado, funcionalmente caracterizado e sua atividade antimicrobiana foi novamente reavaliada (Lopez-Abarrategui *et al.*, 2012b). A fração sequenciada da molécula foi digerida com tripsina e exibiu um peptídeo de 10 aminoácidos e massa molecular de 1224 Da. Análises estruturais revelaram que o Cm-p1 é uma molécula hidrofílica com um pequeno núcleo hidrofóbico flanqueado por aminoácidos básicos nos extremos, não sendo considerada uma molécula anfipática (Lopez-Abarrategui *et al.*, 2012b). Na Figura 21 está ilustrada a estrutura tridimensional do Cm-p1.

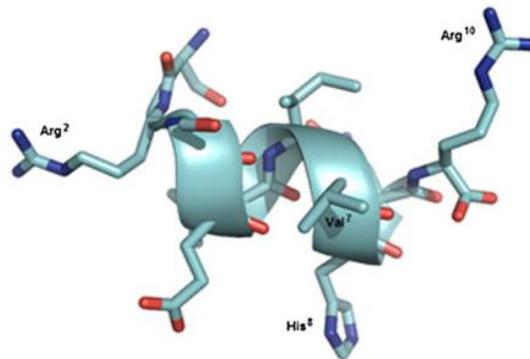


Figura 21. Estrutura tridimensional do Cm-p1. Em azul estão as regiões catiônicas e, em vermelho, as regiões aniônicas. Os resíduos destacados podem estar relacionados ao mecanismo de ação do Cm-p1.

Entretanto, diferentemente do peptídeo isolado, o peptídeo sintético apresentou atividade contra fungos filamentosos e leveduras além de não mostrar efeitos tóxicos contra células humanas (Lopez-Abarrategui *et al.*, 2012b). Na Tabela 6 estão enumerados os microrganismos patogênicos ao homem os quais o Cm-p1 sintético apresentou atividade com as suas respectivas concentrações inibitórias mínimas.

Tabela 6. Atividade antifúngica do Cm-p1 sintético.

Microrganismos	Concetração inibitória mínima (µM)
<i>Candida albicans</i> 01U	13
<i>Candida albicans</i> 38U	7
<i>Candida parapsilosis</i>	105
<i>Cryptococcus neoformans</i> L26	209
<i>Cryptococcus neoformans</i> L30	209
<i>Trichophyton rubrum</i>	3

Fonte: adaptado de López-Abarrategui *et al* 2012b.

Os resultados encontrados em relação à atividade do Cm-p1 contra fungos patogênicos ao homem abrem caminho para o aprofundamento dos estudos de mecanismo de ação e sua aplicabilidade em sistemas de liberação controlada.

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, 95% das moléculas com potencial terapêutico apresentam propriedades cinéticas e biofarmacêuticas pobres apresentando dificuldades relacionadas à baixa solubilidade, difusividade, meia-vida no sistema circulatório, controle de liberação e imunogenicidade. Os fármacos em geral, produzem efeitos por reagirem com outras moléculas e, desta forma, podem causar efeitos nos mais diversos níveis da organização biológica. Neste sentido, ensaios biológicos são necessários para avaliar e comparar a atividade de futuros fármacos. Estes ensaios se definem pela estimativa da concentração, da potência e da resposta biológica produzida pelo fármaco de interesse. Desta forma, a produção de nanoestruturas carreadoras de fármacos tem se mostrado uma ferramenta útil, uma vez que possuem capacidade de transportar moléculas bioativas, de forma específica, a órgãos e tecidos alvo. Possibilitando, assim, maior especificidade, baixa toxicidade, alta absorção e potencial terapêutico. O peptídeo Cm-p1, extraído do molusco *Centrichis muricatus*, em sua forma sintética apresentou atividade contra *Candida albicans*, um dos principais fungos causadores de infecções hospitalares, surgindo como uma alternativa viável à prevenção e combate dessas infecções. A incorporação desses peptídeos antimicrobianos em sistemas de liberação controlada de fármacos, possibilitando o aumento da solubilidade dessas moléculas, e a melhora na sua estabilidade se apresenta como uma ferramenta no desenvolvimento e novos produtos com o objetivo de serem utilizados na prevenção e combate de infecções hospitalares.

3 HIPÓTESE

A incorporação do peptídeo sintético Cm-p1 em nanofibras produzidas por *electrospinning* pode produzir um sistema de liberação controlada com atividade antifúngica contra *Candida albicans*.

4 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanofibras por electrospinning contendo o peptídeo antimicrobiano Cm-p1 com atividade contra *Candida albicans*.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ▶ Desenvolver nanofibras a partir do álcool polivinílico (PVA) contendo o peptídeo antimicrobiano Cm-p1;
- ▶ Analisar as características morfológicas relacionadas ao diâmetro das fibras por microscopia eletrônica de varredura e a espessura por microscopia de força atômica;
- ▶ Avaliar o perfil de liberação do Cm-p1 das nanofibras;
- ▶ Avaliar a atividade antifúngica das nanofibras contendo o Cm-p1 contra *Candida albicans*;
- ▶ Realizar estudos de toxicidade das nanofibras em células humanas e avaliar a sua interferência na viabilidade celular.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 SÍNTESE QUÍMICA E ANÁLISE DO PEPTÍDEO CM-P1

O peptídeo foi comprado da empresa Peptide 2.0 (EUA) onde foi sintetizado com 95 % de pureza. A massa molecular do Cm-p1 foi confirmada por espectrometria de massa (Autoflex, Bruker Daltonics, Billerica, MA). O peptídeo puro foi dissolvido em um volume mínimo de água destilada e misturado com o ácido α -ciano-4-hidroxicinamico saturado na solução matriz (1:3, v:v), fixado na placa de MALDI ToF e seco a temperatura ambiente por 10 min. A solução de α -ciano-4-hidroxicinamico foi preparada a 50 mM em H₂O:ACN:TFA (50:50:0.3, v:v:v). A massa monoisotópica foi obtida no modo refletor com calibração externa, usando *Peptide Calibration Standard II* (até 4,000 Da Bruker Daltonics, Billerica, MA). As concentrações do peptídeo sintético foram determinadas usando a medida da absorvância nos comprimentos de onda de 205, 215 e 225, (Murphy e Kies, 1960).

5.2 PRODUÇÃO DAS NANOFIBRAS POR *ELECTROSPINNING*

Diferentes concentrações do Cm-p1 (2.5 %, 5 % e 10 %, p/v) foram solubilizadas em 0.5 mL de água destilada e mantidas sob agitação até a completa solubilização. Posteriormente, 50 mg de PVA foram adicionados vagarosamente à solução e mantidos sob agitação a 70 °C até a completa solubilização para produzir uma solução 10 % p/v. O processo de *electrospinning* foi montado na configuração horizontal. Uma seringa plástica de 1 mL acoplada a uma agulha em aço inox (BD, calibre 12) foi carregada com a solução Cm-p1-PVA e as nanofibras foram produzidas usando uma voltagem de 15 kV e um fluxo de 0.2 ml.h⁻¹ (NE-2000, New Era, Pump Systems Inc.). A distância de trabalho entre a ponta da agulha e o coletor foi de 10 cm e o material produzido foi coletado em folha de papel alumínio.

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para análise morfológica das nanofibras por microscopia eletrônica de varredura, um microscópio Zeiss DSM 962 (Carl Zeiss, Germany) foi usado. Amostras das nanofibras foram

fixadas da superfície dos suportes usando uma fita condutora de carbono dupla-face. Os suportes foram cobertos com uma fina camada de ouro (20 nm) usando o Sputter Coat Emitech K550. As imagens geradas foram analisadas e capturadas e o diâmetro e distribuição do diâmetro das fibras foram determinados usando aumento de 10,000x pelo software Image J Tool para Windows, versão 3.0. Análises estatísticas foram feitas usando Microsoft Excel, e análise de variância one-way (ANOVA) (Chen *et al.*, 2012a).

5.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)

Imagens de MFA foram obtidas no JPK Instruments Nanowizard II (Berlin, Germany) montados no microscópio invertido Carl Zeiss Axiovert 200 (Jena, Germany). As imagens foram feitas no modo contado intermitente usando cantilevers de silicone ACL do AppNano (Huntingdon, UK) com uma ponteira de raio de 6 nm, frequência de ressonância de aproximadamente 190 kHz e deformação constante de 58 N/m. Todas as imagens foram obtidas com os mesmos parâmetros (ajustes de voltagem, taxa de escaneamento e ganho). A taxa de escaneamento escolhida foi entre 0.3 e 0.6 Hz e o ajuste de voltagem próximo de 0.3 V. As imagens coletadas foram analisadas com o software de processamento do JPK image versão 4.2.53 (JPK Instruments) (Liu *et al.*, 2013).

5.5 PERFIL DE LIBERAÇÃO DO CM-P1 DAS NANOFIBRAS

As características de liberação do Cm-p1 das nanofibras Cm-p1-PVA foram determinadas pelo método de eluição *in vitro* (Chen *et al.* 2012a). Amostras com uma área de 2 cm × 2 cm foram cortadas de cada concentração das microfibras e foram colocadas em frascos de vidro de 5 mL (uma amostra por frasco) com 1 mL de solução tampão fosfato (0.15 mol.L⁻¹, pH 7.4) em cada. Os frascos de vidro foram incubados a 37 °C por 24 h, quando o eluente foi coletado e analisado. Nova solução tampão fosfato (1 mL) foi adicionado novamente a cada frasco por outro período de 24 h e o procedimento foi repetido por 15 dias. A concentração do peptídeo no eluente foi determinada usando uma curva padrão em cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) (Chen *et al.*, 2012a).

Simultaneamente outro experimento de perfil de liberacao foi realizado, onde amostras com a mesma área foram cortadas das nanofibras das três concentrações e as nanofibras foram

acondicionadas em frascos de vidro (5 mL) contendo 1 mL de solução tampão fosfato (0.15 mol.L⁻¹, pH 7.4). Os frascos foram incubados a 37 °C por 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 8, 12 e 24 h. O eluente foi coletado e analisado usando a curva padrão produzida por RP-HPLC. Para cada tempo foram realizadas 3 réplicas. Para a quantificação do peptídeo, uma curva padrão com quantidades conhecidas do Cm-p1 foi realizada (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mg). As amostras foram pesadas em balança analítica (AND GH-202, EUA). O desvio padrão para amostra foi de 5 % para cada corrida em coluna analítica C18 em gradiente linear de acetonitrila de 5 a 95 % e 0.01 % de TFA. A equação linear de regressão obtida foi de $y = 1297x + 201$ com valor de R² igual a 0.996 e foi utilizada para a quantificação de todas as amostras. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

5.6 AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA

Bioensaio contra *C. albicans* foi realizado pela medida da inibição do crescimento pelo método de difusão radial (RDA) (Eriksen *et al* 2013). Placas de Sabouraud dextrose foram feitas dissolvendo 10 g.L⁻¹ peptona, 20 g.L⁻¹ dextrose, e 4 % agar em água destilada e a solução foi autoclavada. As soluções teste foram preparadas a partir de amostras de 2 cm × 2 cm das nanofibras colocadas em tubos de vidro contendo 1 mL de água destilada autoclavada e foram então incubadas por 24 h a 37 °C e 200 rpm. As amostras foram então liofilizadas e solubilizadas em 20 µL água destilada autoclavada. Furos circulares foram feitos no Ágar Sabouraud dextrose com ponteiros de pipeta 20-200 µL. Dentro dos furos, 20 µL das amostras teste foram adicionados. 10 mL do ágar Sabouraud dextrose foram então misturados com 5 mL de suspensão fúngica crescida por 16 h. A mistura foi então vertida na placa de Petri e a placa foi incubada a 37 °C. Anfotericina B (30 µg.ml⁻¹) foi usada como controle positivo. As placas foram inspecionadas no dia seguinte e a zona de inibição do crescimento da *C. albicans* foi medido pelo Image J Tool para Windows versão 3.0. Análises estatísticas foram feitas usando Microsoft Excel, e análise de variância one-way (ANOVA).

5.7 CULTURA CELULAR

Macrófagos RAW 264.7 de camundongos foram obtidos da ATCC (TIB-71), sendo crescidos em meio DMEM suplementado com 10 % de soro bovino fetal e 1 % de

penicilina/estreptomicina a 37 °C em 5 % CO₂. Células HUVEC (Lonza) foram crescidas em meio basal endotelial (2 (EGM-2 BulletKit, Lonza) suplementado com fatores de crescimento (hFGF-β, hidrocortisona, VEGF, R3-IGF-1, ácido ascórbico, heparina, soro bovino fetal e hEGF).

5.8 ANÁLISE DE TOXICIDADE DAS NANOFIBRAS COM CÉLULAS HUMANAS

Macrófagos RAW 264.7 humanos (2×10^3 células por poço) foram adicionados e crescidos por 24 h e tratados com diferentes concentrações do Cm-p1 em placa de 96 poços. Como controle positivo, as células RAW 264.7 foram tratados com LPS (100 ng.mL^{-1}). A secreção das citocinas IL6 e TNF-α por células RAW foi quantificada por ELISA (SA Biosciences). Cada experimento foi realizado em triplicata (Marrache e Dhar, 2013).

5.9 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE/PROLIFERAÇÃO CELULAR

De forma similar, a viabilidade/proliferação de células HUVEC na presença de diferentes concentrações do Cm-p1 (2,5 %, 5 %, 10 %) nas nanofibras foi medida usando o teste MTS (composto tetrazolium) (Promega). 2×10^4 HUVECs foram crescidas por 24 h na presença de nanofibras contendo o peptídeo e a absorbância foi medida por um leitor de placas no comprimento de 490 nm. Cada experimento foi realizado em triplicata (Hasan *et al.*, 2014).

5.10 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR CÉLULAS HUVEC

A produção intracelular de espécies reativas de oxigênio por células HUVEC devido à exposição às nanofibras contendo diferentes concentrações do Cm-p1 foi avaliada (Cell Biolabs, Inc). 2×10^4 de células HUVECs foram crescidas na presença das nanofibras por 24 h e a fluorescência foi avaliada por leitor de microplaca a 480 nm/530 nm. O ensaio usa uma sonda permeável fluorogênica, 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, para avaliar e

quantificar os sinais de ROS. A intensidade da fluorescência encontrada em cada poço é diretamente proporcional ao nível de ROS no citoplasma celular (Koontz and Kontrogianni-Konstantopoulos, 2014). Em experimento complementar, células HUVEC crescidas na presença das nanofibras por 48 h foram coradas com calceína AM (Life Technologies) para caracterizar a viabilidade celular.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PRODUÇÃO DAS NANOFIBRAS DE CM-P1-PVA E DETECÇÃO DO PEPTÍDEO

Nanofibras contendo o peptídeo antimicrobiano Cm-p1 foram produzidas por *electrospinning* usando o PVA como polímero. Durante o processo de produção, parâmetros como voltagem e distância entre o coletor e o capilar foram mantidos. Primeiramente, Cm-p1 foi solubilizado em água deionizada sob agitação (200 rpm) e, então, 10 % de PVA foi adicionado à solução contendo o peptídeo já solubilizado. A natureza hidrofílica do Cm-p1 permite a sua solubilização em água deionizada. PVA, um polímero sintético tem sido usado na produção de nanofibras por *electrospinning* (Peresin MS *et al.*, 2010) atraindo a atenção devido a sua biocompatibilidade, hidrofiliçidade, propriedades físicas e resistência química (Yang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009). Adicionalmente, fibras produzidas com PVA têm sido aplicadas nos mais diferentes campos como imobilização de enzimas, eletrodos, sensores e aplicações biomédicas (Agarwal *et al.*, 2008; Meinel *et al.*, 2012).

Primeiramente, análises de espectrometria de massa foram realizadas com o objetivo de detectar a presença e ausência do Cm-p1 nas nanofibras. O peptídeo livre, com massa molecular de 1224 Da foi demonstrado por MS (Figura 22a). Idêntica massa molecular foi obtida através da ionização direta da fibra contendo o peptídeo (Figura 22b). O resultado observado reforça a ideia que o peptídeo está ligado com a fibra através de interações fracas. Por outro lado, a fibra sem o peptídeo também foi avaliada demonstrando a completa ausência do Cm-p1 no material (Figura 22c).

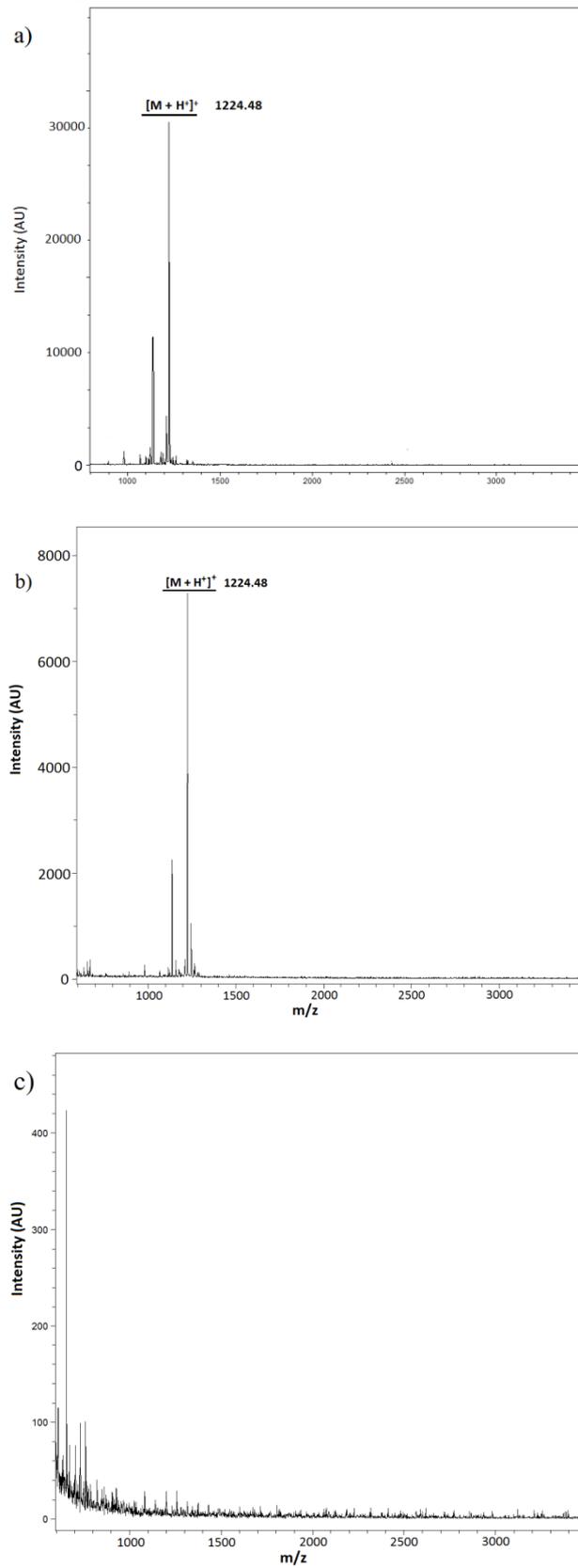


Figura 22. Análises de espectrometria de massa do (a) Cm-p1 livre, (b) Cm-p1-PVA incorporado nas nanofibras e (c) nanofibras sem o peptídeo.

6.2 CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DAS FIBRAS

Análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas para efetuar as medidas dos diâmetros das fibras (Figuras 23a e 23b). A média do diâmetro das fibras contendo o Cm-p1-PVA está listada na Tabela 6 juntamente com os seus respectivos desvios padrão. As micrografias na Figura 23 mostram que o diâmetro das fibras decresce com a presença do Cm-p1 quando comparado ao diâmetro da fibra PVA. Ademais, o desvio padrão observado na fibra PVA foi menor quando comparado com as fibras contendo o peptídeo, indicando que as fibras PVA são mais homogêneas e livres de deformações e gotas em comparação com as fibras Cm-p1-PVA.

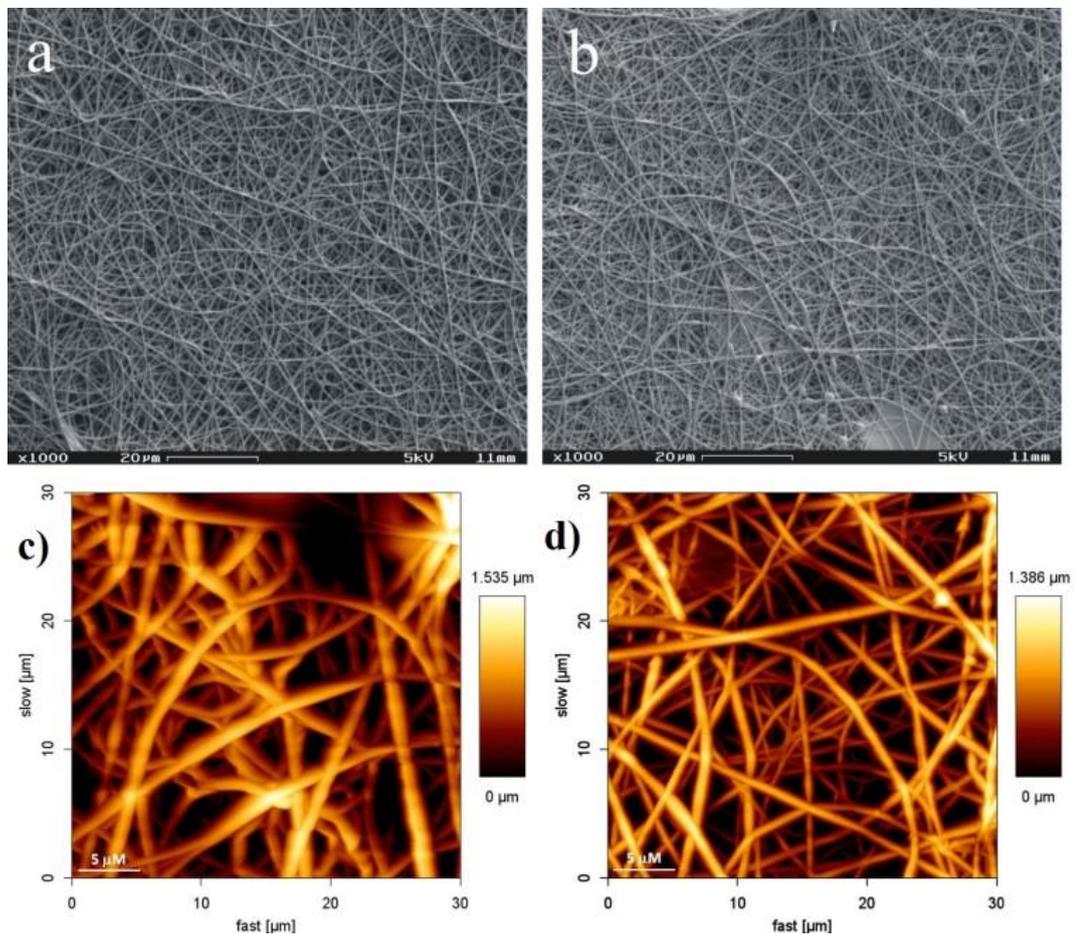


Figura 23. Imagens de SEM and AFM das fibras PVA e Cm-p1-PVA. (a) Fibras 10 % PVA no aumento de 1000x por SEM, (b) Fibras 10 % Cm-p1- PVA no aumento de 1000x por SEM, (c) Fibras 10 % PVA por AFM and (d) Fibras 10 % Cm-p1- PVA por AFM.

Micrografias de microscopia de força atômica foram feitas visto que esta técnica permite a medida de superfícies frágeis e adesivas sem prejudicar as amostras (Zhang *et al.*, 2013a). De fato, imagens de AFM confirmaram os resultados da MEV, mostrando que a espessura das fibras 10 % Cm-p1-PVA (Figura 23d) foram menor que as fibras PVA (Figura 23c), apresentando 1386 nm e 1535 nm, respectivamente. Em medidas complementares, o diâmetro das fibras também foi avaliado por AFM. Da mesma forma que as medidas por MEV, as medidas por AFM apresentaram diâmetros menores que a amostra controle (Tabela 6).

Tabela 7. Medidas do diâmetro das nanofibras por SEM e por AFM com os seus respectivos desvios-padrão.

Nanofibra	Diâmetro por SEM (nm)	Desvio padrão (nm)	Diâmetro por AFM (nm)	Desvio padrão (nm)
PVA	335,9	28,2	990,9	128,9
2,5 % Cm-p1-PVA	295,3	45,0	570,8	81,6
5 % Cm-p1-PVA	293,5	45,8	716,8	122,1
10 % Cm-p1-PVA	210,6	47,0	550,2	144,4

Entretanto, por AFM, o diâmetro das fibras foi maior que os medidos por MEV em todas as amostras analisadas. É possível, que durante as medidas por AFM, as amostras podem ter absorvido umidade, ao contrário do que acontece com as medidas por MEV, quando as amostras são submetidas ao vácuo. Ainda, deve-se ressaltar que as medidas mostraram que os diâmetros das fibras apresentaram menor uniformidade nas amostras 10 % Cm-p1-PVA segundo as Figuras 23a e 23b, sugerindo que altas concentrações do Cm-p1 podem interferir na morfologia da fibra devido a interrupções no jato durante a formação das fibras e à obstrução do capilar levando à formação de gotas na amostra de 10 % Cm-p1-PVA. Nanofibras contendo o peptídeo antimicrobiano nisina também mostram menor diâmetro quando comparado às fibras sem o peptídeo (Heunis *et al* 2013). Vários fatores podem afetar a estrutura e propriedades das nanofibras como a distância entre o coletor e a agulha, o diâmetro da agulha, a condutividade e viscosidade da solução, a tensão superficial da solução na ponta da agulha e o fluxo aplicado à solução (Fung *et al.*, 2011). Em relação às nanofibras Cm-p1-PVA, é possível que a viscosidade da solução possa ter influenciado no diâmetro e morfologia das fibras produzidas durante o processo de *electrospinning* devido a alterações na condutividade e tensão superficial da solução (Heunis *et al* 2013).

Wang e colaboradores (2011) mostraram que a morfologia da fibra foi afetada devido à viscosidade da solução. Nanofibras produzidas a partir de soluções altamente viscosas levaram à formação de gotas e deformações quando comparadas à nanofibras produzidas por soluções com baixa viscosidade. A redução do diâmetro das fibras também foi visualizada por Li e colegas (2013) devido ao aumento da condutividade da solução. Isto pode ocorrer porque soluções com alta condutividade podem ter maior habilidade no transporte de cargas e alterar as forças de alongamento sobre o jato na formação das fibras (Sill e von Recum, 2008; Li *et al.*, 2013).

6.3 PERFIL DE LIBERAÇÃO DO CM-P1 DAS NANOFIBRAS

O perfil de liberação do Cm-p1 das nanofibras Cm-p1-PVA é demonstrado na Figura 24. O peptídeo foi rapidamente liberado das nanofibras Cm-p1-PVA. A Figura 24a mostra que após 120 min, Cm-p1 foi liberado no meio de dissolução em todas as concentrações avaliadas. Em paralelo, outro fragmento das nanofibras foi incubado em um tubo de vidro a 37 °C. O meio de dissolução foi trocado a cada 24 h, até o terceiro dia, sem remover o fragmento do tubo e então o peptídeo foi novamente quantificado no meio de dissolução. Figura 24b mostra que a liberação do Cm-p1 das nanofibras foi maior durante as primeiras 24 h, gradualmente diminuindo após 48 h e 72 h, provavelmente devido à redução da concentração no interior das nanofibras. Esse perfil de liberação é desejável visto que esta propriedade pode ser aplicada a um biomaterial com atividade anti-infectiva. Nanofibras produzidas por PVA podem constituir um material que rápida degradação em ambientes hidrofílicos. A rápida liberação do Cm-p1 das nanofibras Cm-p1-PVA pode ter sido desencadeada pela grande superfície de contato e porosidade do material. Entretanto, alguns estudos sugerem o crosslinking do PVA com o objetivo de diminuir a hidrofilicidade do polímero e, então aumentar o tempo de dissolução das nanofibras feitas de PVA (Zeng *et al.*, 2005; Gohil *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009). O peptídeo antimicrobiano sintético crabolin foi marcado com fluoresceína (iCR-fluor) e foi incorporado em nanofibras de PCL e apresentou um 30 % de liberação após os primeiros 30 min. Após um período de 2 h a liberação do iCR-fluor alcançou uma taxa de 50 % (Eriksen *et al.*, 2013). A liberação cumulativa do peptídeo plantaricin 423 de fibras formadas pela mistura dos polímeros poli(D,L-láctico) e óxido de poli(etileno) foi avaliada por Heunis e colaboradores (2011) e mostrou uma alta liberação no

início e depois manteve a liberação sustentada da bacteriocina por um período superior a 8 dias.

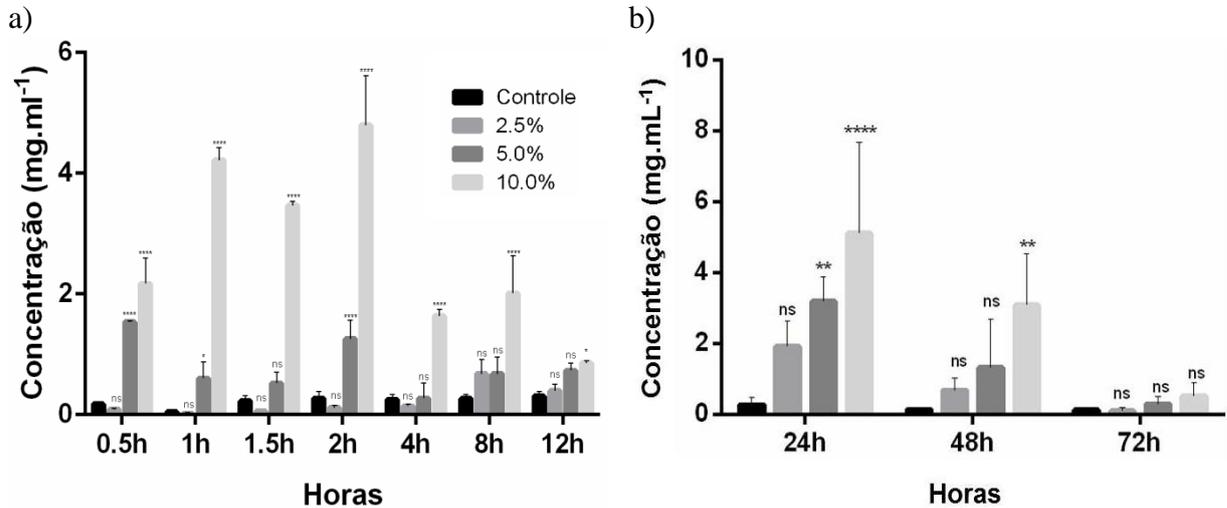


Figura 24. Perfil de liberação do Cm-p1 das nanofibras Cm-p1-PVA (a) usando diferentes amostras em horas e (b) usando as mesmas amostras até 72 horas. NS: não significativo. (* $P < 0.1$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$).

6.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A atividade antifúngica das nanofibras Cm-p1-PVA contra *C. albicans* foi avaliada pelo método de difusão radial (RDA) pela comparação do halo de inibição entre a anfotericina (30 mg.mL⁻¹), o peptídeo livre e a fibra controle (PVA). As concentrações usadas do Cm-p1 para a realização do bioensaio foram quantificadas por HPLC a partir da quantificação realizadas após 24 h de liberação. A lista com as quantificações utilizadas para a realização do bioensaio e as respectivas medidas dos raios de inibição é apresentada na Tabela 7.

Tabela 6. Lista contendo as respectivas quantificações do Cm-p1 após 24 h de liberação e as medidas do raio de inibição em meio ágar Sabouraud dextrose contra *C. albicans* ATCC 10231.

Composto	Concentração (mg.mL ⁻¹)	Medida do raio de inibição (mm)
Anfotericina	30 mg.mL ⁻¹	14.10 mm
Cm-p1 livre	4 mg.mL ⁻¹	9.27 mm
PVA fibra	N/A	N/D
2.5 % Cm-p1- PVA fibra	1.92 mg.mL ⁻¹	N/D
5 % Cm-p1- PVA fibra	3.04 mg.mL ⁻¹	N/D
10 % Cm-p1- PVA fibra	5.26 mg.mL ⁻¹	3.94 mm

Nota: N/A: não aplicável; N/D: não detectável

Em ensaio antifúngico prévio, nenhum halo de inibição foi visualizado quando as fibras foram colocadas diretamente na placa contendo o meio Sabouraud dextrose. Somente as nanofibras 10 % Cm-p1-PVA foram viáveis em inibir o crescimento de *C. albicans* após as mesmas terem sido solubilizadas em água destilada. Apesar dos resultados encontrados da atividade do Cm-p1, em resultados preliminares (Lopez-Abarrategui *et al.*, 2012b) o peptídeo apresentou maior atividade que as fibras 10 % Cm-p1-PVA. Segundo Hassounah e colegas (2013), a formação de pontes de hidrogênio entre os grupos amino da droga e os grupamentos hidroxila do PVA podem levar a desativação de drogas devido a alta polaridade do átomo de oxigênio dos grupamentos hidroxila do PVA (Hassounah *et al* 2013).

6.5 BIOCOMPATIBILIDADE DAS NANOFIBRAS CM-P1-PVA COM CÉLULAS HUMANAS

Viabilidade de células HUVEC foi avaliada na presença das diferentes concentrações do peptídeo Cm-p1 nas nanofibras usando o teste MTS (Figura 25a). Nenhuma das concentrações do peptídeo nas nanofibras foram viáveis em afetar a viabilidade das células HUVEC quando comparadas com nanofibras PVA. Esses resultados confirmam os estudos preliminares conduzidos por Lopez-Abarrategui e colegas (2012b), que encontraram resultados semelhantes usando o peptídeo Cm-p1 livre contra macrófagos murinos Raw 264.7. Entretanto, a proliferação das células HUVEC foi afetada na presença de nanofibras 10 % Cm-p1-PVA, como mostrado na Figura 4c. Contudo para fibras PVA, 2,5 % Cm-p1-PVA e 5 % Cm-p1-PVA alteraram a agregação e proliferação celular. A geração de ROS na presença de diferentes formulações nas nanofibras também foi determinada. Somente 10 % Cm-p1-PVA nanofibras induziram a formação de ROS por células HUVEC (Figura 25b). Dados similares foram obtidos usando o PvD, uma defensina antifúngica com atividade contra *C. albicans* obtida das sementes da *Phaseolus vulgaris*. Este peptídeo apresenta atividade fungicida a partir da permeabilização da membrana celular e da geração de estresse oxidativo, com a produção de ROS e óxido nítrico (Mello *et al.*, 2011; Guilhelmelli *et al.*, 2013). O mesmo mecanismo também foi descrito para outra defensina de plantas, a HsAFP1 da *Heuchera sanguinea* (Aerts *et al.*, 2011), que induz a geração de vários sinais pro-apoptóticos incluindo o acúmulo de ROS, levando à morte celular. Diferentemente do Cm-p1, HsAFP1 e PvD foram capazes de induzir a morte celular pela geração de ROS em baixas concentrações, usando $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Segundo os dados na Figura 25b e os

resultados da atividade antifúngica, é possível que o mecanismo de ação do Cm-p1 possa envolver a geração de ROS devido a um aumento na sua produção quando comparada às outras nanofibras avaliadas. Entretanto, outros estudos são necessários para confirmar esta afirmativa.

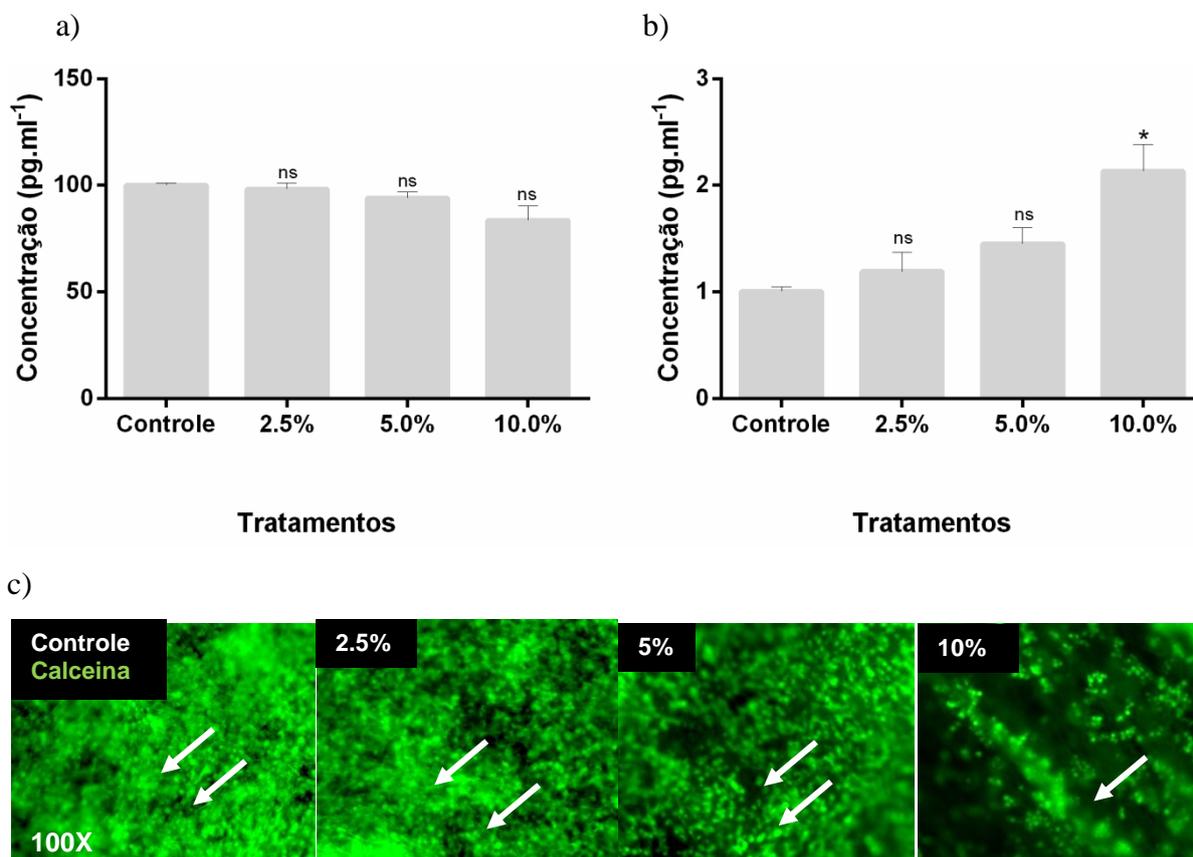


Figura 25. Biocompatibilidade das nanofibras contendo o peptídeo antimicrobiano Cm-p1. (a) Avaliação da viabilidade de células HUVEC. A viabilidade relativa foi determinada usando o teste MTS e todos os valores foram normalizados para os valores obtidos no grupo controle. (b) Geração de espécies reativas de oxigênio por diferentes concentrações do Cm-p1 nas nanofibras foi determinada e comparada ao grupo controle. (c) Viabilidade das células HUVEC (em verde) na presença das nanofibras coradas com calceína; menor agregação e proliferação são notadas no grupo 10 % Cm-p1-PVA (setas brancas) quando comparada a outros. Os dados são representados em \pm SD. (* $P < 0.1$).

A secreção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α (Figura 26a) e IL-6 (Figura 26b) por macrófagos RAW 264.7 após 24 h de exposição foi avaliada usando as fibras PVA e Cm-p1-PVA nas diferentes concentrações. Somente 10 % Cm-p1-PVA nanofibras apresentaram significativa geração de citocinas quando comparadas às fibras PVA. Neste contexto, a capacidade de induzir a secreção de citocinas para promover o recrutamento de células imunes por catelicidinas está bem caracterizada. A liberação de TNF- α e IL-6 foi induzida pela catelicidina LL-37 em queratinócitos e células dendríticas em baixas concentrações

(Afshar e Gallo, 2013, Duplantier e Hoek, 2013). A bacteriocina plataricin A, produzida pelo *Lactobacillus plantarum* também elevou a migração e proliferação celular, bem como estimulou a expressão do fator de crescimento vascular endotelial e IL-8 em queratinócitos (Pinto *et al.*, 2011). Kindrachuk e colegas (2013) demonstraram que o peptídeo antimicrobiano nisina Z apresenta atividade imunomodulatória e modula a resposta de células imunes similarmente a peptídeos que apresentam atividade imunomodulatória. Embora Cm-p1 tenha induzido a secreção de IL6 e TNF- α em células humanas em altas concentrações, esse peptídeo não apresentou efeitos tóxicos sobre as células.

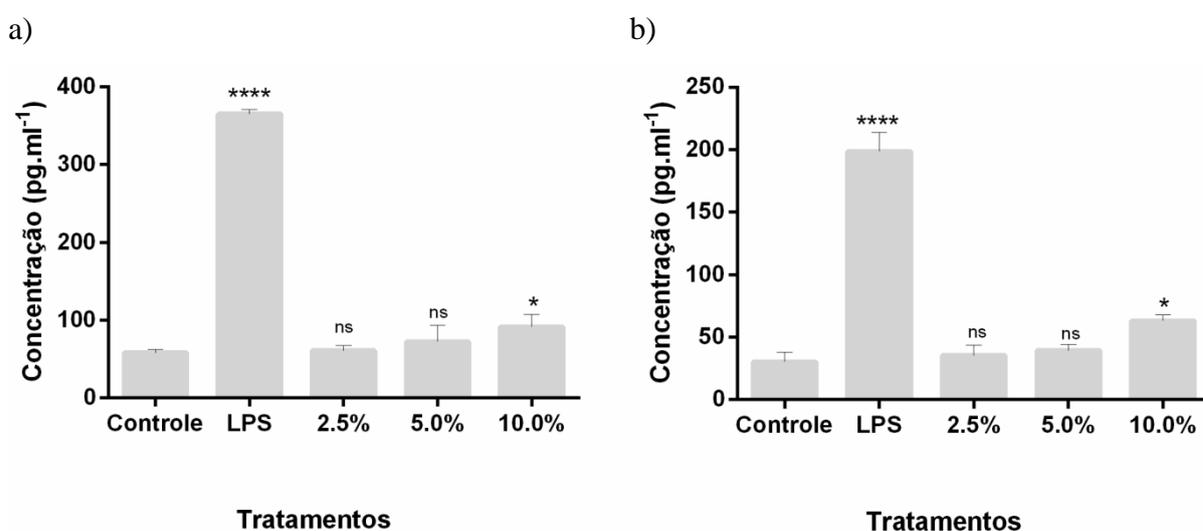


Figura 26. Avaliação da secreção das citocinas pró-inflamatórias (a) TNF- α e (b) IL6 por macrófagos RAW 264.7 após 24 h de exposição às PVA e Cm-p1-PVA nanofibras por ELISA. LPS foi usado como controle positivo. Os dados são representados em \pm SD. NS: não significativo. (* $P < 0.1$; **** $P < 0.0001$)

7 CONCLUSÃO

Essa é a primeira vez que um peptídeo antifúngico com atividade contra *C. albicans* é incorporado em nanofibras produzidas por *electrospinning*. Até o momento, poucos peptídeos antimicrobianos têm sido incorporados neste sistema de liberação controlada. Essas fibras podem promover a homeostase, absorção de fluidos, respiração celular e permeação de gases, além de proteção anti-infectiva em casos de feridas e queimados. Entretanto, o desenvolvimento de testes clínicos usando estas moléculas ainda permanece incipiente, sendo que mais estudos são necessários como, por exemplo, a realização de testes *in vivo*. O desenvolvimento deste trabalho permitiu concluir que:

- ▶ O peptídeo Cm-p1 foi incorporado em nanofibras produzidas por *electrospinning* em diferentes concentrações;
- ▶ As análises por MALDI-TOF MS permitiram identificar o Cm-p1 diretamente nas fibras em todas as concentrações analisadas, sem que a amostra tenha passado por algum tratamento;
- ▶ O peptídeo Cm-p1, em altas concentrações, foi capaz de induzir a geração de espécies reativas de oxigênio e a secreção das citocinas inflamatórias IL6 e TNF- α , sem afetar a viabilidade de células humanas.
- ▶ O sistema de nanofibras utilizado permite a liberação do peptídeo por até três dias, sendo que nas primeiras duas horas ocorreram *bursts* de liberação da molécula no meio de dissolução;
- ▶ A atividade antifúngica do Cm-p1 contra *C. albicans* pode ter sido prejudicada pelo PVA, sendo que o uso de outros polímeros deve ser testado.

8 PERSPECTIVAS

Esta tese de doutorado é parte integrante de um projeto de pesquisa que procura produzir peptídeos antimicrobianos ativos a partir de sistemas heterólogos visando o seu emprego em sistemas de liberação controlada de fármacos. Os resultados obtidos reforçam a viabilidade de produção dessas moléculas em *Escherichia coli* e *Nicotiana benthamiana* apesar dos problemas encontrados na purificação a partir de plantas.

Os resultados também mostram que a incorporação dessas moléculas em nanofibras permite a modulação do seu efeito conforme o polímero empregado. Assim, experimentos de clivagem e purificação de peptídeos antimicrobianos de sistemas heterólogos devem ser conduzidos com o objetivo de alcançar moléculas puras e ativas para o seu emprego em sistemas carreadores.

Variações nos parâmetros do electrospinning, concentração do polímero e mesmo o emprego de uma mistura de polímeros para a formação das fibras poderiam resultar em perfis de liberação e atividade diferentes.

Dessa forma, este trabalho abre fronteiras para o aprimoramento e condução de estudos de mecanismo de ação, farmacocinética e ensaios in vivo visando melhor caracterizar as moléculas empregadas e, assim, contribuir para que, num futuro recente, esses peptídeos possam estar disponíveis comercialmente.

9 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos publicados

1. CANDIDO, E. D. S.; CARDOSO, M. H. S.; AMARO, D.; **VIANA, J. F. C.**; JUNIOR, N. G.; MIRANDA, V.; FRANCO, O. L.. The use of versatile plant antimicrobial peptides in agribusiness and human health. *Peptides (New York, N.Y. 1980)*, 2014.
2. LIMA, T. B.; PINTO, M. F. S.; RIBEIRO, S. M.; DE LIMA, L. A.; **VIANA, J. F. C.**; JUNIOR, N. G.; CANDIDO, E. D. S.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L.. Bacterial resistance mechanism: what proteomics can elucidate. *The FASEB Journal*, v. 27, p. 1291-1303, 2013
3. **VIANA, J. F. C.**; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L.; LACORTE, C. C. Heterologous Production of Peptides in Plants: Fusion Proteins and Beyond. *Current Protein and Peptide Science*, v. 14, p. 568-579, 2013.

Artigo submetido

1. **VIANA, J. F. C.**; CARRIJO, J.; FREITAS, C. G.; PAUL, A.; ALCARAZ, J.; LACORTE, C.; MIGLIOLO, L.; ANDRADE, C. A.; FALCÃO, R.; SANTOS, N. C.; GONÇALVES, S. OTERO-GONZÁLEZ, A. J.; KHADEMROSSEINI, A.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Antifungal nanofibers made by controlled release of sea animal derived peptide. *Nanoscale*.

Capítulos de livro publicados

1. **VIANA, J. F. C.**; LACORTE, C. C.. Quantificação de proteínas. In: Octávio L. Franco; Clarissa P. da C. Gomes; Simoni C. Dias. (Org.). *Manual para estudo de proteínas*. 1ed. Florianópolis: Bookess, 2014.
2. CANDIDO, E. S., AMARO, D., PORTO, W. F., **VIANA, J. F. C.**, Dias. S. C., Franco. O. L. Structural and functional insights into plant bactericidal peptides In: *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. 2 ed. Barcelona: Formatex, 2011, v.1, p. 112-119.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelgawad, AM; Hudson, SM; Rojas, OJ (2014). Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems. *Carbohydrate polymers* 100:166-178.

Abreu, FOMS (2008). Síntese e caracterização de hidrogéis biodegradáveis à base de quitosana com morfologia controlada com potencial aplicação como carreadores de fármacos Doutorado thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Abrigo, M; McArthur, S; Kingshott, P (2014). Electrospun nanofibers as dressings for chronic wound care: advances, challenges, and future prospects. *Macromolecular Bioscience* 14:772-792.

Aerts, AM; Bammens, L; Govaert, G; Carmona-Gutierrez, D; Madeo, F; Cammue, BP *et al.* (2011). The antifungal plant defensin HsAFP1 from *Heuchera sanguinea* induces apoptosis in *Candida albicans*. *Frontiers in Microbiology* 2:47.

Afshar, M; Gallo, RL (2013). Innate immune defense system of the skin. *Veterinary Dermatology* 24:32-38 e38-39.

Agarwal, S; Wendorff, JH; Greiner, A (2008). Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* 49:5603–5621.

Alanis, AJ (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research* 36:697-705.

Almasia, NI; Bazzini, AA; Hopp, HE; Vazquez-Rovere, C (2008). Overexpression of snakin-1 gene enhances resistance to *Rhizoctonia solani* and *Erwinia carotovora* in transgenic potato plants. *Molecular Plant Pathology* 9:329-338.

Alvarez, ML; Topal, E; Martin, F; Cardineau, GA (2010). Higher accumulation of F1-V fusion recombinant protein in plants after induction of protein body formation. *Plant Molecular Biology* 72:75-89.

ANVISA (2007). Ministério da Saúde: Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. In: ANVISA: Brasil.

APECIH (2005). Infecções hospitalares no Brasil: uma medida de sua magnitude nos anos 1990 e comparação com os índices europeus. <http://www.apecih.org.br/infecoes_hospitalareshtm> Acesso em: 20 fev 2013.

Asadzadeh, M; Al-Sweih, NA; Ahmad, S; Khan, Z (2008). Antifungal susceptibility of clinical *Candida parapsilosis* isolates in Kuwait. *Mycoses* 51:318-323.

Asmundsdottir, LR; Erlendsdottir, H; Haraldsson, G; Guo, H; Xu, J; Gottfredsson, M (2008). Molecular epidemiology of candidemia: evidence of clusters of smoldering nosocomial infections. *Clinical Infectious Diseases* 47:e17-24.

Aujard, Y; Rajguru, M; Bingen, E (2000). Nosocomial infections in pediatrics. Problems and perspectives. *Pathologie Biologie* 48:909-920.

Avila, ACD; Huguenot, C, O. ; Resende, RD; Kitajima, EW; Goldbach, RW; Peters, D (1990). Serological differentiation of 20 isolates of tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology* 71:2801-2807.

Bao, J; Yang, B; Sun, Y; Zu, Y; Deng, Y (2013). A berberine-loaded electrospun poly-(epsilon-caprolactone) nanofibrous membrane with hemostatic potential and antimicrobial property for wound dressing. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 9:1173-1180.

Batalia, MA; Monzingo, AF; Ernst, S; Roberts, W; Robertus, JD (1996). The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family. *Nature Structural Biology* 3:19-23.

Bawa, R (2009). Exploring global advances in nanomedicine. *NanoBiotech* 5:5-7.

Berger, J; Reist, M; Mayer, JM; Felt, O; Peppas, NA; Gurny, R (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics eV* 57:19-34.

Bernaodat, F; Frelet-Barrand, A; Pochon, N; Dementin, S; Hivin, P; Boutigny, S *et al.* (2011). Heterologous expression of membrane proteins: choosing the appropriate host. *PloS one* 6:p.e29191.

Bogomolovas, J; Simon, B; Sattler, M; Stier, G (2009). Screening of fusion partners for high yield expression and purification of bioactive viscotoxins. *Protein Expression and Purification* 64:16-23.

Bonfietti, LX; Szeszs, M; Chang, M; Martins, M; Pukinskas, S; Nunes, M *et al.* (2012). Ten-Year study of species distribution and antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates at a Brazilian Tertiary Hospital. *Mycopathologia* 174:389-396.

Boohaker, RJ; Zhang, G; Lee, MW; Nemeč, KN; Santra, S; Perez, JM *et al.* (2012). Rational development of a cytotoxic peptide to trigger cell death. *Molecular Pharmaceutics* 9:2080–2093.

Bowman, SM; Free, SJ (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 28:799-808.

Bradford, MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Brajtburg, J; Powderly, WG; Kobayashi, GS; Medoff, G (1990). Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34:183-188.

- Brandelli, A (2012). Nanostructures as promising tools for delivery of antimicrobial peptides. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 12:731-741.
- Brito, LR; Guimaraes, T; Nucci, M; Rosas, R; Paula Almeida, L; Da Matta, D *et al.* (2006). Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. *Medical Mycology* 44:261-266.
- Brogden, KA (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* 3:238-250.
- Bulaj, G (2005). Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. *Biotechnology Advances* 23:87-92.
- Bulet, P; Cociancich, S; Dimarcq, JL; Lambert, J; Reichhart, JM; Hoffmann, D *et al.* (1991). Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. *The Journal of Biological Chemistry* 266:24520-24525.
- Burnette, WN (1981). Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *Analytical Biochemistry* 112:195-203.
- Cabral, KM; Almeida, MS; Valente, AP; Almeida, FC; Kurtenbach, E (2003). Production of the active antifungal *Pisum sativum* defensin 1 (Psd1) in *Pichia pastoris*: overcoming the inefficiency of the STE13 protease. *Protein Expression and Purification* 31:115-122.
- Cândido, ES; Porto, WF; Amaro, DS; Viana, JC; Dias, SC; Franco, OL (2011). Structural and functional insights into plant bactericidal peptides. In: Méndez-Vilas A. (ed). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. FORMATEX. pp 951-960.
- Cândido, ES; Cardoso, M; Sousa, D; Viana, F; Oliveira-Júnior, N; Miranda, V *et al.* (2014). The use of versatile plant antimicrobial peptides in agribusiness and human health. *Peptides*:65-78.
- Capparelli, R; Ventimiglia, I; Palumbo, D; Nicodemo, D; Salvatore, P; Amoroso, MG *et al.* (2007). Expression of recombinant puroindolines for the treatment of staphylococcal skin infections (acne vulgaris). *Journal of Biotechnology* 128:606-614.
- Chen, DW; Hsu, YH; Liao, JY; Liu, SJ; Chen, JK; Ueng, SW (2012a). Sustainable release of vancomycin, gentamicin and lidocaine from novel electrospun sandwich-structured PLGA/collagen nanofibrous membranes. *International Journal of Pharmaceutics* 430:335-341.
- Chen, DW; Liao, JY; Liu, SJ; Chan, EC (2012b). Novel biodegradable sandwich-structured nanofibrous drug-eluting membranes for repair of infected wounds: an in vitro and in vivo study. *International Journal of Nanomedicine* 7:763-771.

Cho, J; Sung, B; Kim, S (2009). Buforins: Histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788:1564-1569.

Christensen, T., Trabbic-Carlson, K., Liu, W. Chilkoti, A. Purification of recombinant proteins from *Escherichia coli* at low expression levels by inverse transition cycling. *Analytical Biochemistry*, v.360, n.1, p.166-168, 2007.

Cohen, ML (1992). Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science* 257:1050-1055.

Cole, AM; Liao, HI; Ganz, T; Yang, O (2003). Antibacterial activity of peptides derived from envelope glycoproteins of HIV-1. *FEBS Letters* 535:195-199.

Collin, F; Thompson, R; Jolliffe, K; Payne, R; Maxwell, A (2013). Fragments of the bacterial toxin microcin B17 as gyrase poisons. *PloS One* 8:e61459.

Colombo, AL; Nucci, M; Park, B; Nouér, S; Arthington-Skaggs, B; da Matta, D *et al.* (2006). Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology* 44:2816-2823.

Commandeur, S; Van Beusekom, HM; Van Der Giessen, WJ (2006). Polymers, drug release, and drug-eluting stents. *Journal of Interventional Cardiology* 19:500-506.

Conley, A; Joensuu, J; Menassa, R; Brandle, J (2009). Induction of protein body formation in plant leaves by elastin-like polypeptide fusions. *BMC Biology* 7:48.

Conley, AJ; Joensuu, JJ; Richman, A; Menassa, R (2011a). Protein body-inducing fusions for high-level production and purification of recombinant proteins in plants. *Plant Biotechnology Journal* 9:419-433.

Conley, AJ; Zhu, H; Le, LC; Jevnikar, AM; Lee, BH; Brandle, JE *et al.* (2011b). Recombinant protein production in a variety of *Nicotiana* hosts: a comparative analysis. *Plant Biotechnology Journal* 9:434-444.

Cruz-Chamorro, L; Puertollano, MA; Puertollano, E; De Cienfuegos, GA; De Pablo, MA (2006). In vitro biological activities of magainin alone or in combination with nisin. *Peptides* 27:1201-1209.

Cunningham, F; Deber, CM (2007). Optimizing synthesis and expression of transmembrane peptides and proteins. *Methods* 41:370-380.

Cuthbertson, BJ; Büllsbach, EE; Fievet, J; Bachère, E; Gross, PS (2004). A new class (penaeidin class 4) of antimicrobial peptides from the Atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) exhibits target specificity and an independent proline-rich-domain function. *Biochemical Journal* 381:79-86.

Cuthbertson, BJ; Bullesbach, EE; Gross, PS (2006). Discovery of synthetic penaeidin activity against antibiotic-resistant fungi. *Chemical Biology & Drug Design* 68:120-127.

Dandagi, PM; Mastiholimath, VS; Patil, MB; Gupta, MK (2006). Biodegradable microparticulate system of captopril. *International Journal of Pharmaceutics* 307:83-88.

Daniell, H; Chebolu, S; Kumar, S; Singleton, M; Falconer, R (2005). Chloroplast-derived vaccine antigens and other therapeutic proteins. *Vaccine* 23:1779-1783.

Dave, R; Jayaraj, P; Ajikumar, PK; Joshi, H; Mathews, T; Venugopalan, VP (2013). Endogenously triggered electrospun fibres for tailored and controlled antibiotic release. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 24:1305-1319.

de Beer, A; Vivier, MA (2008). Vv-AMP1, a ripening induced peptide from *Vitis vinifera* shows strong antifungal activity. *BMC Plant Biology* 8:75.

De Lucca, AJ; Bland, JM; Vigo, CB; Jacks, TJ; Peter, J; Walsh, TJ (2000). D-cecropin B: proteolytic resistance, lethality for pathogenic fungi and binding properties. *Medical Mycology* 38:301-308.

De, S; Robinson, D (2003). Polymer relationships during preparation of chitosan-alginate and poly-L-lysine-alginate nanospheres. *Journal of Controlled Release* 89:101-112.

Degray, G; Rajasekaran, K; Smith, F; Sanford, J; Daniell, H (2001). Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiology* 127:852-862.

Desai, PN; Shrivastava, N; Padh, H (2010). Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression. *Biotechnology Advances* 28:427-435.

Devocelle, M (2012). Targeted antimicrobial peptides. *Frontiers in Immunology* 3:309.

Dimopoulos, G; Karabinis, A; Samonis, G; Falagas, M (2007). Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 26:377-384.

Doll, T; Raman, S; Dey, R; Burkhard, P (2013). Nanoscale assemblies and their biomedical applications. *Journal of the Royal Society Interface* 10:20120740.

Duncan, R (2006). Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nature Reviews Cancer* 6:688-701.

Duplantier, AJ; Hoek, MLv (2013). The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 as a potential treatment for polymicrobial infected wounds. *Frontiers in Immunology* 4:143.

Edgerton, M; Koshlukova, SE; Lo, TE; Chrzan, BG; Straubinger, RM; Raj, PA (1998). Candidacidal activity of salivary histatins. Identification of a histatin 5-binding protein on *Candida albicans*. *The Journal of Biological Chemistry* 273:20438-20447.

Egorov, TA; Odintsova, TI; Pukhalsky, VA; Grishin, EV (2005). Diversity of wheat antimicrobial peptides. *Peptides* 26:2064-2073.

- Eriksen, TH; Skovsen, E; Fojan, P (2013). Release of antimicrobial peptides from electrospun nanofibres as a drug delivery system. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 9:492-498.
- Fischbach, MA; Walsh, CT (2010). Antibiotics for emerging pathogens. *Science* 325:1089-1093.
- Fox, J (2013). Antimicrobial peptides stage a comeback. *Nature Biotechnology* 31:379-382.
- Franco, OL; Murad, AM; Leite, JR; Mendes, PA; Prates, MV; Bloch, C, Jr. (2006). Identification of a cowpea gamma-thionin with bactericidal activity. *FEBS Journal* 273:3489-3497.
- Fung, W; Yuen, K; Liong, M (2011). Agrowaste-based nanofibers as a probiotic encapsulant: fabrication and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:8140-8147.
- Ganz, T (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 3:710-720.
- Gao, AG; Hakimi, SM; Mittanck, CA; Wu, Y; Woerner, BM; Stark, DM *et al.* (2000). Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature Biotechnology* 18:1307-1310.
- Gaynes, R; Edwards, JR (2005). Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clinical Infectious Diseases* 41:848-854.
- Gleba, Y; Klimyuk, V; Marillonnet, S (2005). Magniflection--a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* 23:2042-2048.
- Godoy, P; Tiraboschi, IN; Severo, L; Bustamante, B; Calvo, B; Almeida, L *et al.* (2003). Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98:401-405.
- Gohil, JM; Bhattacharya, A; Ray, P (2006). Studies on the cross-linking of poly(vinyl alcohol). *Journal of Polymer Research* 13:161-169.
- Gomord, V; Faye, L (2004). Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 7:171-181.
- Gordon, YJ; Romanowski, EG; McDermott, AM (2005). A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti infective drugs. *Current Eye Research* 30: 505-515.
- Guilhelmelli, F; Vilela, N; Albuquerque, P; Derengowski, LD; Silva-Pereira, I; Kyaw, CM (2013). Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology* 4:353.

- Hamori, M; Yoshimatsu, S; Hukuchi, Y; Shimizu, Y; Fukushima, K; Sugioka, N *et al.* (2014). Preparation and pharmaceutical evaluation of nano-fiber matrix supported drug delivery system using the solvent-based electrospinning method. *International Journal of Pharmaceutics* 464:243-251.
- Han, D; Steckl, A (2013). Triaxial electrospun nanofiber membranes for controlled dual release of functional molecules. *Applied Materials & Interfaces* 5:8241–8245.
- Hancock, RE; Scott, MG (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:8856-8861.
- Haney, EF; Nazmi, K; Bolscher, JG; Vogel, HJ (2012). Influence of specific amino acid side chains on the antimicrobial activity and structure of bovine lactoferrampin. *Biochemistry and Cell Biology* 90:362-377.
- Harlow, E; Lane, D (1988). Antibodies A laboratory manual. *Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*:471-504.
- Hartl, FU; Hayer-Hartl, M (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295:1852-1858.
- Hartley, JL; Temple, GF; Brasch, MA (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research* 10:1788-1795.
- Hasan, A; Memic, A; Annabi, N; Hossain, M; Paul, A; Dokmeci, M *et al.* (2014). Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. *Acta Biomaterialia* 10:11-25.
- Hassounah, IA; Shehata, NA; Kimsawatde, GC; Hudson, AG; Sriranganathan, N; Joseph, EG *et al.* (2013). Studying the activity of antituberclucosis drugs inside electrospun PVA, PEO and PCL nanofibers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. doi: 10.1002/jbm.a.35070
- Heunis, T; Bshena, O; Klumperman, B; Dicks, L (2011). Release of bacteriocins from nanofibers prepared with combinations of poly(d,l-lactide) (PDLLA) and poly(ethylene oxide) (PEO). *International Journal of Molecular Sciences* 12:2158-2173.
- Heunis, TD; Smith, C; Dicks, LM (2013). Evaluation of a nisin-eluting nanofiber scaffold to treat *Staphylococcus aureus*-induced skin infections in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57:3928-3935.
- Hidron, AI; Edwards, JR; Patel, J; Horan, TC; Sievert, DM; Pollock, DA *et al.* (2008). NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007 *Infection Control and Hospital Epidemiology* 29:996-1011.

Hoffman, AS (2002). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54:3-12.

Horn, DL; Fishman, JA; Steinbach, W; Anaissie, E; Marr, K; Olyaei, A *et al.* (2007). Presentation of the PATH Alliance registry for prospective data collection and analysis of the epidemiology, therapy, and outcomes of invasive fungal infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 59:407-414.

Huang, J; Cao, L; Guo, W; Yuan, R; Jia, Z; Huang, K (2012). Enhanced soluble expression of recombinant *Flavobacterium heparinum* heparinase I in *Escherichia coli* by fusing it with various soluble partners. *Protein Expression and Purification* 83:169-176.

Husain, S; Alexander, BD; Munoz, P; Avery, RK; Houston, S; Pruett, T *et al.* (2003). Opportunistic mycelial fungal infections in organ transplant recipients: emerging importance of non-Aspergillus mycelial fungi. *Clinical Infectious Diseases* 37:221-229.

Ignatious, F; Sun, L; Lee, CP; Baldoni, J (2010). Electrospun nanofibers in oral drug delivery. *Pharmaceutical Research* 27:576-588.

Imamura, T; Yasuda, M; Kusano, H; Nakashita, H; Ohno, Y; Kamakura, T *et al.* (2010). Acquired resistance to the rice blast in transgenic rice accumulating the antimicrobial peptide thanatin. *Transgenic Research* 19:415-424.

Imura, T; Otake, K; Hashimoto, S; Gotoh, T; Yuasa, M; Yokoyama, S *et al.* (2003). Preparation and physicochemical properties of various soybean lecithin liposomes using supercritical reserve phase evaporation method. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* 27.

Ingham, AB; Moore, RJ (2007). Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 47:1-9.

Islam, M; Nagao, J; Zendo, T; Sonomoto, K (2012). Antimicrobial mechanism of lantibiotics. *Biochemical Society Transactions* 40:1528-1533.

Iwai, T; Kaku, H; Honkura, R; Nakamura, S; Ochiai, H; Sasaki, T *et al.* (2002). Enhanced resistance to seed-transmitted bacterial diseases in transgenic rice plants overproducing an oat cell-wall-bound thionin. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 15:515-521.

Jain, RA (2000). The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 21:2475-2490.

Jenssen, H; Hamill, P; Hancock, R (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 19:491-511.

Jha, S; Chattoo, BB (2010). Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens. *Transgenic Research* 19:373-384.

Joseph, M; Ludevid, MD; Torrent, M; Rofidal, V; Tauzin, M; Rossignol, M *et al.* (2012). Proteomic characterisation of endoplasmic reticulum-derived protein bodies in tobacco leaves. *BMC Plant Biology* 12:36.

Kaneider, N; Djanani, A; Wiedermann, C (2007). Heparan sulfate proteoglycan–involving immunomodulation by cathelicidin antimicrobial peptides LL-37 and PR-39 *The Scientific World Journal* 7:1832-1838.

Kayaci, F; Umu, O; Tekinay, T; Uyar, T (2013). Antibacterial electrospun poly(lactic acid) (PLA) nanofibrous webs incorporating triclosan/cyclodextrin inclusion complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:3901–3908.

Keller, B; Sauer, N; Lamb, CJ (1988). Glycine-rich cell wall proteins in bean: gene structure and association of the protein with the vascular system. *EMBO Journal* 7:3625-3633.

Kett, DH; Azoulay, E; Echeverria, M; Vincent, J; Investigators., EPoliISEIGo (2011). Candida bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Critical Care Medicine* 39:665-670.

Kim, K; Luu, Y; Chang, C; Fang, D; Hsiao, B; Chu, B *et al.* (2004). Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds. *Journal of Controlled Release* 98:47-56.

Kindrachuk, J; Jenssen, H; Elliott, M; Nijnik, A; Magrangeas-Janot, L; Pasupuleti, M *et al.* (2013). Manipulation of innate immunity by a bacterial secreted peptide: lantibiotic nisin Z is selectively immunomodulatory. *Innate immunity* 19:315-327.

Klevens, RM; Edwards, JR; Richards, CLJ; Horan, TC; Gaynes, RP; Pollock, DA *et al.* (2007). Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals 2002. *Public Health Reports* 122:160-166.

Kong, KF; Schneper, L; Mathee, K (2010). Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 118:1-36.

Kovalskaya, N; Hammond, RW (2009). Expression and functional characterization of the plant antimicrobial snak-in-1 and defensin recombinant proteins. *Protein Expression and Purification* 63:12-17.

Kriegel, C; Kit, KM; McClements, DJ; J., W (2009). Nanofibers as carrier systems for antimicrobial microemulsions. Part I: fabrication and characterization. *Langmuir* 25:1154-1161.

Kriegel, C; Kit, KM; McClements, DJ; J., W (2010). Nanofibers as carrier systems for antimicrobial microemulsions. II. release characteristics and antimicrobial activity. *Journal of Applied Polymer Science* 118:2859-2868.

Kudla, G; Murray, AW; Tollervy, D; Plotkin, JB (2009). Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. *Science* 324:255-258.

Kumar, K; Yadav, S; Purayannur, S; Verma, PK (2012). An alternative approach in Gateway((R)) cloning when the bacterial antibiotic selection cassettes of the entry clone and destination vector are the same. *Molecular Biotechnology* 54:133-140.

Kung, HC; Hoyert, DL; Xu, J; Murphy, SL (2008). Deaths: final data for 2005. *National Vital Statistics Reports* 56:1-120.

Kuzucu, C; Durmaz, R; B., O; E., A; H., G; Z., C (2008). Species distribution, antifungal susceptibility and clonal relatedness of *Candida* isolates from patients in neonatal and pediatric intensive care units at a medical center in Turkey. *New Microbiologica* 31:401-408.

Kwak, KJ; Kim, YO; Kang, H (2005). Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress. *Journal of Experimental Botany* 56:3007-3016.

Kyle, S; James, KA; Mcpherson, MJ (2012). Recombinant production of the therapeutic peptide lunasin. *Microbial Cell Factories* 11. doi: 10.1186/1475-2859-11-28.

Lacorte, C; Ribeiro, SG; Lohuis, D; Goldbach, R; Prins, M (2007). The nucleoprotein of tomato spotted wilt virus as protein tag for easy purification and enhanced production of recombinant proteins in plants. *Protein Expression and Purification* 55:17-22.

Laemmli, UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lalani, R; Liu, L (2012). Electrospun zwitterionic poly(sulfobetaine methacrylate) for nonadherent, superabsorbent, and antimicrobial wound dressing applications. *Biomacromolecules* 13:1853-1863.

Lehner, R; Wang, X; Marsch, S; Hunziker, P (2013). Intelligent nanomaterials for medicine: Carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 9:742-757.

Levy, CE (2004). Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. *ANVISA Ministério da Saúde*.

Levy, SB; Marshall, B (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 10:122-129.

Li, C; Fu, R; Yu, CM; Li, Z; Guan, H; Hu, D *et al.* (2013). Silver nanoparticle/chitosan oligosaccharide/poly(vinyl alcohol) nanofibers as wound dressings: a preclinical study. *International Journal of Nanomedicine*:4131-4145.

Li, Y; Li, X; Wang, G (2006). Cloning, expression, isotope labeling, and purification of human antimicrobial peptide LL-37 in *Escherichia coli* for NMR studies. *Protein Expression and Purification* 47:498-505.

- Li, Y; Li, X; Li, H; Lockridge, O; Wang, G (2007a). A novel method for purifying recombinant human host defense cathelicidin LL-37 by utilizing its inherent property of aggregation. *Protein Expression and Purification* 54:157-165.
- Li, Y; Li, X; Wang, G (2007b). On-resin cleavage of bacterially expressed fusion proteins for purification of active recombinant peptides SK-29, KR-20, LL-29, and LL-23 from human sweat or skin. *Protein Expression and Purification* 55:395-405.
- Li, Y; Chen, Z (2008). RAPD: a database of recombinantly-produced antimicrobial peptides. *FEMS Microbiology Letters* 289:126-129.
- Li, Y (2009). Carrier proteins for fusion expression of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 54:1-9.
- Li, Y (2011a). Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. *Protein Expression and Purification* 80:260-267.
- Li, Y (2011b). Self-cleaving fusion tags for recombinant protein production. *Biotechnology Letters* 33:869-881.
- Li, Y; Xiang, Q; Zhang, Q; Huang, Y; Su, Z (2012). Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* 37:207-215.
- Lima-Filho, JV; Patriota, JM; Silva, AF; Filho, NT; Oliveira, RS; Alencar, NM *et al.* (2010). Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Journal of Ethnopharmacology* 129:327-334.
- Lindner, HB; Zhang, A; Eldridge, J; Demcheva, M; Tschlis, P; Seth, A *et al.* (2011). Anti-bacterial effects of poly-N-acetyl-glucosamine nanofibers in cutaneous wound healing: requirement for Akt1. *PLoS One* 6:e18996.
- Liu, Y; Bolger, B; Cahill, PA; McGuinness, GB (2009). Water resistance of photocrosslinked polyvinyl alcohol based fibers. *Materials Letters* 63:419-421.
- Liu, Y; Yang, Y; Wang, C; Zhao, X (2013). Stimuli-responsive self-assembling peptides made from antibacterial peptides. *Nanoscale* 5:6413-6421.
- Lopez-Abarrategui, C; Alba, A; Lima, LA; Maria-Neto, S; Vasconcelos, IM; Oliveira, JT *et al.* (2012a). Screening of antimicrobials from Caribbean sea animals and isolation of bactericidal proteins from the littoral mollusk *Cenchritis muricatus*. *Current Microbiology* 64:501-505.
- Lopez-Abarrategui, C; Alba, A; Silva, ON; Reyes-Acosta, O; Vasconcelos, IM; Oliveira, JT *et al.* (2012b). Functional characterization of a synthetic hydrophilic antifungal peptide derived from the marine snail *Cenchritis muricatus*. *Biochimie* 94:968-974.

- Lopez-Martinez, R (2010). Candidosis, a new challenge. *Clinics in Dermatology* 28:178-184.
- Lopez, PJ; Marchand, I; Joyce, SA; Dreyfus, M (1999). The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. *Molecular Microbiology* 33:188-199.
- Lowy, FD (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation* 111:1265-1273.
- Lupetti, A; Danesi, R; Campa, M; Del Tacca, M; Kelly, S (2002). Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends in Molecular Medicine* 8:76-81.
- Maclean, J; Koekemoer, M; Olivier, AJ; Stewart, D; HitzerothI, I; Rademacher, T *et al.* (2007). Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *Journal of General Virology* 88:1460-1469.
- Madine, J; Davies, H; Shaw, C; Hamley, I; Middleton, D (2012). Fibrils and nanotubes assembled from a modified amyloid-b-peptide fragment differ in the packing of the same β -sheet building blocks. *Chemical Communications* 48:2976- 2978.
- Mahdavi, F; Sariah, M; Maziah, M (2012). Expression of rice thaumatin-like protein gene in transgenic banana plants enhances resistance to fusarium wilt. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 166:1008-1019.
- Makino, T; Skretas, G; Georgiou, G (2011). Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. *Microbial Cell Factories* 10:32.
- Malheiros Pda, S; Sant'anna, V; Barbosa Mde, S; Brandelli, A; Franco, BD (2012). Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. *International Journal of Food Microbiology* 156:272-277.
- Mandal, S; Roy, A; Ghosh, A; Hazra, T; Basak, A; Franco, O (2014a). Challenges and future prospects of antibiotic therapy: from peptides to phages utilization. *Frontiers in Pharmacology* 5:105.
- Mandal, SM; Roy, A; Mahata, D; Migliolo, L; Nolasco, DO; Franco, OL (2014b). Functional and structural insights on self-assembled nanofiber-based novel antibacterial ointment from antimicrobial peptides, bacitracin and gramicidin S. *The Journal of Antibiotics* doi: 10.1038/ja.2014.70.
- Mandard, N; Sodano, P; Labbe, H; Bonmatin, JM; Bulet, P; Hetru, C *et al.* (1998). Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two-dimensional nuclear magnetic resonance data. *European Journal of Biochemistry /FEBS* 256:404-410.

Mangoni, ML; Shai, Y (2009). Temporins and their synergism against Gram-negative bacteria and in lipopolysaccharide detoxification. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788:1610-1619.

Manzoni, P; Farina, D; Galletto, P; Leonessa, M; Priolo, C; Arisio, R *et al.* (2007). Type and number of sites colonized by fungi and risk of progression to invasive fungal infection in preterm neonates in neonatal intensive care unit. *Journal of Perinatal Medicine* 35:220-226.

Marchetti, O; Bille, J (2004). Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: Secular trends, 1991-2000. *Clinical Infectious Diseases* 38:311-320.

Marillonnet, S; Thoeringer, C; Kandzia, R; Klimyuk, V; Gleba, Y (2005). Systemic Agrobacterium tumefaciens-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnology* 23:718-723.

Marrache, S; Dhar, S (2013). Biodegradable synthetic high-density lipoprotein nanoparticles for atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:9445-9450.

Marriott, DJ; Playford, EG; Chen, S; Slavin, M; Nguyen, Q; Ellis, D *et al.* (2009). Determinants of mortality in non-neutropenic ICU patients with candidaemia. *Crit Care Med* 13:R115.

Martin, GS; Mannino, DM; Eaton, S; Moss, M (2003). The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New England Journal of Medicine* 348:1546-1554.

Matlow, AG; Morris, SK (2009). Control of antibiotic-resistant bacteria in the office and clinic. *Canadian Medical Association Journal* 180:1021-1024.

Mean, M; Marchetti, O; Calandra, T (2008). Bench-to-bedside review: Candida infections in the intensive care unit. *Critical Care* 12. doi: 10.1186/cc6212.

Meinel, AJ; Germershaus, O; Luhmann, T; Merkle, HP; Meinel, L (2012). Electrospun matrices for localized drug delivery: current technologies and selected biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* eV 81:1-13.

Mello, EO; Ribeiro, SFF; Carvalho, AO; Santos, IS; Da Cunha, M; Santa-Catarina, C *et al.* (2011). Antifungal activity ofPvD1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells. *Current Microbiology* 62:1209-1217.

Miranda, L; Rodrigues, EC; Costa, SF; van der Heijden, IM; Dantas, KC; Lobo, RD *et al.* (2012). *Candida parapsilosis* candidaemia in a neonatal unit over 7 years: a case series study. *BMJ Open* 2. doi: 10.1136/bmjopen-2012-000992.

Mohiti-Asli, M; Pourdeyhimi, B; Lobo, E (2014). Skin tissue engineering for the infected wound site: biodegradable PLA nanofibers and a novel approach for silver ion release

evaluated in a 3D coculture system of keratinocytes and *Staphylococcus aureus*. *Tissue Engineering Part C: Methods*.

Molina, A; Mena, M; Carbonero, P; Garcia-Olmedo, F (1997). Differential expression of pathogen-responsive genes encoding two types of glycine-rich proteins in barley. *Plant Molecular Biology* 33:803-810.

Moon, JY; Henzler-Wildman, KA; Ramamoorthy, A (2006). Expression and purification of a recombinant LL-37 from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 9:28.

Moran, C; Grussemeyer, CA; Spalding, J; Benjamin, DJ; Reed, S (2010). Comparison of costs, length of stay, and mortality associated with *Candida glabrata* and *Candida albicans* bloodstream infections. *American Journal of Infection Control* 38:78-80.

Mousavi, A; Hotta, Y (2005). Glycine-rich proteins: a class of novel proteins. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 120:169-174.

Moyes, DL; Naglik, JR (2011). Mucosal immunity and *Candida albicans* infection. *Clinical and Developmental Immunology*:346307.

Mulder, KC; Lima, LA; Miranda, VJ; Dias, SC; Franco, OL (2013). Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. *Frontiers in Microbiology* 31:4:321.

Müller, A; Münch, D; Schmidt, Y; Reder-Christ, K; Schiffer, G; Bendas, G *et al.* (2012). Lipodepsipeptide empedopeptin inhibits cell wall biosynthesis through Ca²⁺-dependent complex formation with peptidoglycan precursors. *The Journal of Biological Chemistry* 287:20270-20280.

Murashige, T; Skoog, FA (1962). Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.

Murphy, JB; Kies, MW (1960). Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solution. *Biochimica et Biophysica Acta* 45:382-384.

Nan, Y; Park, K; Park, Y; Jeon, Y; Kim, Y; Park, S *et al.* (2009). Investigating the effects of positive charge and hydrophobicity on the cell selectivity, mechanism of action and anti-inflammatory activity of a Trp-rich antimicrobial peptide indolicidin. *FEMS Microbiology Letters* 292:134-140.

Nascimento, GGF; Locatelli, J; Freitas, PC; Silva, GL (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 31:247-256.

Nguyen, LT; Haney, EF; Vogel, HJ (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology* 29:464-472.

Nicolas, P (2009). Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS Journal* 276:6483-6496.

Nocek, B; Tikhonov, A; Babnigg, G; Gu, M; Zhou, M; Makarova, K *et al.* (2012). Structural and functional characterization of microcin C resistance peptidase MccF from *Bacillus anthracis*. *Journal of Molecular Biology* 420:366-383.

Oard, SV; Enright, FM (2006). Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Cell Reports* 25:561-572.

Oey, M; Lohse, M; Kreikemeyer, B; Bock, R (2009). Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *Plant Journal* 57:436-445.

Olaechea, PM; Insausti, J; Blanco, A; Luque, P (2010). Epidemiology and impact of nosocomial infections. *Medicina Intensiva* 34:256-267.

Palmer, GD; Robinson, PG; SJ, C; W, B; D, C; PL, E *et al.* (1996). Aetiological factors for oral manifestations of HIV. *Oral Diseases* 2:193-197.

Parachin, NS; Mulder, KC; Viana, AA; Dias, SC; Franco, OL (2012). Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. *Peptides* 38:446-456.

Paredes-Gamero, EJ; Martins, MN; Cappabianco, FA; Ide, JS; Miranda, A (2012). Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides: regulated cell death or membrane disruption. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820:1062-1072.

Park, CB; Kim, MS; Kim, SC (1996). A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo* gargarizans. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 218:408-413.

Park, CB; Kim, HS; Kim, SC (1998). Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244:253-257.

Park, CN; Lee, JM; Lee, D; Kim, BS (2008). Antifungal activity of valinomycin, a peptide antibiotic produced by *Streptomyces* sp. strain M10 antagonistic to *Botrytis cinerea*. *Journal of microbiology and biotechnology* 18:880-884.

Pazgier, M; Lubkowski, J (2006). Expression and purification of recombinant human alpha-defensins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 49:1-8.

Peleg, AY; Hooper, DC (2010). Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *The New England Journal of Medicine* 362:1804-1813.

Pelegriani, PB; Murad, AM; Silva, LP; Dos Santos, RC; Costa, FT; Tagliari, PD *et al.* (2008). Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against Gram-negative bacteria. *Peptides* 29:1271-1279.

Pelegriani, PB; Farias, LR; Saude, AC; Costa, FT; Bloch, C, Jr.; Silva, LP *et al.* (2009). A novel antimicrobial peptide from *Crotalaria pallida* seeds with activity against human and phytopathogens. *Current Microbiology* 59:400-404.

Peng, L; Xu, Z; Fang, X; Wang, F; Yang, S; Cen, P (2004). Preferential codons enhancing the expression level of human beta-defensin-2 in recombinant *Escherichia coli*. *Protein and Peptide Letters* 11:339-344.

Pereira, GH; Muller, PR; Szeszs, M; Levin, A; Melhem, M (2010). Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans* Candida species. *Medical Mycology* 48:839-842.

Peresin MS; Y, H; AH, V; OJ, R; JJ, P; JV, S (2010). Effect of moisture on electrospun nanofiber composites of poly(vinyl alcohol) and cellulose nanocrystals. *Biomacromolecules* 11:2471-2477.

Perlroth, J; Choi, B; B., S (2007). Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical Mycology* 45:321-346.

Peti, W; Page, R (2007). Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expression and Purification* 51:1-10.

Pfaller, MA; Diekema, DJ (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews* 20:133.

Pfaller, MA; Diekema, DJ; Gibbs, D; Newell, V; Meis, J; Gould, I *et al.* (2007). Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *Journal of Clinical Microbiology* 45:1735-1745.

Pinto, D; Marzani, B; Minervini, F; Calasso, M; Giuliani, G; Gobbetti, M *et al.* (2011). Plantaricin A synthesized by *Lactobacillus plantarum* induces in vitro proliferation and migration of human keratinocytes and increases the expression of TGF-beta1, FGF7, VEGF-A and IL-8 genes. *Peptides* 32:1815-1824.

Pinto Reis, C; Neufeld, RJ; Ribeiro, AJ; Veiga, F (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2:8-21.

Pittet, D; Allegranzi, B; Storr, J; Bagheri Nejad, S; Dziekan, G; Leotsakos, A *et al.* (2008). Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. *The Journal of Hospital Infection* 68:285-292.

Pogue, GP; Lindbo, JA; Garger, SJ; Fitzmaurice, WP (2002). Making an ally from an enemy: plant virology and the new agriculture. *Annual Review of Phytopathology* 40:45-74.

Porto, W; Nolasco, D; Franco, O (2014). Native and recombinant Pg-AMP1 show different antibacterial activity spectrum but similar folding behavior. *Peptides* 55:92-97.

Qi, H; Hu, P; Xu, J; Wang, A (2006). Encapsulation of drug reservoirs in fibers by emulsion electrospinning: morphology characterization and preliminary release assessment. *Biomacromolecules* 7:2327-2330.

Rao, X; Hu, J; Li, S; Jin, X; Zhang, C; Cong, Y *et al.* (2005). Design and expression of peptide antibiotic hPAB-beta as tandem multimers in *Escherichia coli*. *Peptides* 26:721-729.

Rao, XC; Li, S; Hu, JC; Jin, XL; Hu, XM; Huang, JJ *et al.* (2004). A novel carrier molecule for high-level expression of peptide antibiotics in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 36:11-18.

Ravichandran, R; Venugopal, J; Sundarrajan, S; Mukherjee, S; Forsythe, J; S., R (2013). Click chemistry approach for fabricating PVA/gelatin nanofibers for the differentiation of ADSCs to keratinocytes. *Journal of Materials Science Materials in Medicine* 24:2863-2871.

Rebuffat, S (2012). Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria. *Biochemical Society Transactions* 40:1456-1662.

Rodriguez, D; Almirante, B; Park, B; Cuenca-Estrella, M; Planes, A; Sanchez, F *et al.* (2006). Candidemia in neonatal intensive care units: Barcelona, Spain. *Pediatric Infectious Disease Journal* 25:224-229.

Romeo, V; Gorrasi, G; Vittoria, V; Chronakis, I (2007). Encapsulation and exfoliation of inorganic lamellar fillers into polycaprolactone by electrospinning. *Biomacromolecules* 8:3147-3152.

Roy, A; Franco, OL; Mandal, SM (2013). Biomedical exploitation of self assembled peptide based nano-structures. *Curr Protein Peptide Science* 14:580-587.

Ruckh, TT; Oldinski, RA; Carroll, DA; Mikhova, K; Bryers, JD; Popat, KC (2012). Antimicrobial effects of nanofiber poly(caprolactone) tissue scaffolds releasing rifampicin. *Journal of Materials Science Materials in Medicine* 23:1411-1420.

Ruel-Gariepy, E; Leroux, JC (2004). In situ-forming hydrogels--review of temperature-sensitive systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics eV* 58:409-426.

Sachetto-Martins, G; Franco, LO; De Oliveira, DE (2000). Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochimica et Biophysica Acta* 1492:1-14.

Saiman, L; Ludington, E; Pfaller, M; Rangel-Frausto, S; Wiblin, R; Dawson, J *et al.* (2000). Risk factors for candidemia in Neonatal Intensive Care Unit patients. The National Epidemiology of Mycosis Survey study group. *Pediatric Infectious Disease Journal* 19:319-324.

Sambrook, J; Russell, D (2001). Commonly used techniques in molecular cloning. In: Harbor C.S. (ed). *Sambrook, J. e Russell, D. W. (Ed.). Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: New York, USA.

Sarig, H; Rotem, S; Ziserman, L; Danino, D; Mor, A (2008). Impact of self-assembly properties on antibacterial activity of short acyl-lysine oligomers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52:4308-4314.

Scott II, RD (2009). Division of Healthcare Quality Promotion National Center for Preparedness, Detection, and Control of Infectious Diseases Coordinating Center for Infectious Diseases Centers for Disease Control and Prevention. *Report: The direct medical costs of healthcare-associated infections in US hospitals and the benefits of prevention*. Disponível em: http://www.cdc.gov/hai/pdfs/hai/scott_costpaper.pdf Acesso em: 15 de junho de 2014.

Sebe, I; Szabó, B; Nagy, Z; Szabó, D; Zsidai, L; Kocsis, B *et al.* (2013). Polymer structure and antimicrobial activity of polyvinylpyrrolidone-based iodine nanofibers prepared with high-speed rotary spinning technique. *International Journal of Pharmaceutics* 458:99-103.

Sethuraman, N; Stadheim, TA (2006). Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology* 17:341-346.

Seyednejad, H; Ji, W; Yang, F; van Nostrum, C; Vermonden, T; van den Beucken, J *et al.* (2012). Coaxially electrospun scaffolds based on hydroxyl-functionalized poly(ϵ -caprolactone) and loaded with VEGF for tissue engineering applications. *Biomacromolecules* 13:3650-3660.

Sharma, A; Gupta, A; G. Rath, G; A. Goyal, A; Mathura, R; Dhakate, S (2013). Electrospun composite nanofiber-based transmucosal patch for anti-diabetic drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B* 1.

Sharma, K; Bhatnagar-Mathur, P; Thorpe, T (2005). Genetic transformation technology: Status and problems. In: Plant (ed). *Vitro Cellular & Developmental Biology* pp 102-112.

Shinozuka, H; Hisano, H; Yoneyama, S; Shimamoto, Y; Jones, ES; Forster, JW *et al.* (2006). Gene expression and genetic mapping analyses of a perennial ryegrass glycine-rich RNA-binding protein gene suggest a role in cold adaptation. *Molecular Genetics and Genomics* 275:399-408.

Sill, T; von Recum, H (2008). Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 29:1989-2006.

Skerlavaj, B; Romeo, D; Gennaro, R (1990). Rapid membrane permeabilization and inhibition of vital functions of Gram-negative bacteria by batenecins. *Infection and Immunity* 58:3724-3730.

Sobel, JD (2006). The emergence of non-albicans *Candida* species as causes of invasive candidiasis and candidemia. *Current Infectious Disease Reports* 8:427-433.

- Soletti, RC; Del Barrio, L; Daffre, S; Miranda, A; Borges, HL; Moura-Neto, V *et al.* (2010). Peptide gomesin triggers cell death through L-type channel calcium influx, MAPK/ERK, PKC and PI3K signaling and generation of reactive oxygen species. *Chemico-Biological Interactions* 186:135-143.
- Sorensen, HP; Mortensen, KK (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 115:113-128.
- Speiser, PP (1991). Nanoparticles and liposomes: a state of the art. *Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology* 13:337-342.
- Sridhar, R; Sundarrajan, S; Venugopal, JR; Ravichandran, R; Ramakrishna, S (2013). Electrospun inorganic and polymer composite nanofibers for biomedical applications. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 24:365-385.
- Stotz, HU; Thomson, JG; Wang, Y (2009). Plant defensins: defense, development and application. *Plant Signaling & Behavior* 4:1010-1012.
- Streatfield, SJ (2007). Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnology Journal* 5:2-15.
- Su, L; Chen, S; Yi, L; Woodard, RW; Chen, J; Wu, J (2012). Extracellular overexpression of recombinant *Thermobifida fusca* cutinase by alpha-hemolysin secretion system in *E. coli* BL21(DE3). *Microbial Cell Factories* 11:8.
- Tang, C; Ozcam, A; Stout, B; Khan, S (2012). Effect of pH on protein distribution in electrospun PVA/BSA composite nanofibers. *Biomacromolecules* 13:1269-1278.
- Tavares, LS; Rettore, JV; Freitas, RM; Porto, WF; Duque, AP; Singulani Jde, L *et al.* (2012). Antimicrobial activity of recombinant Pg-AMP1, a glycine-rich peptide from guava seeds. *Peptides* 37:294-300.
- Teixeira, ML; Dos Santos, J; Silveira, NP; Brandelli, A (2008). Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria monocytogenes*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9:49-53.
- Tonglairoum, P; Ngawhirunpat, T; Rojanarata, T; Kaomongkolgit, R; Opanasopit, P (2014). Fast-curing clotrimazole composited PVP/HP β CD nanofibers for oral candidiasis application. *Pharmaceutical Research* Doi 10.1007/s11095-013-1291-1.
- Torrent, M; Llop-Tous, I; Ludevid, MD (2009). Protein body induction: a new tool to produce and recover recombinant proteins in plants. *Methods in Molecular Biology* 483:193-208.
- Torres, NI; Noll, KS; Xu, S; Li, J; Huang, Q; Sinko, PJ *et al.* (2013). Safety, formulation, and in vitro antiviral activity of the antimicrobial peptide subtilisin against herpes simplex virus type 1. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 5:26-35.

- Unnithan, A; Gnanasekaran, G; Sathishkumar, Y; Lee, Y; Kim, C (2014). Electrospun antibacterial polyurethane-cellulose acetate-zein composite mats for wound dressing. *Carbohydrate Polymers* 102:884-892.
- Urbán, P; Valle-Delgado, J; Moles, E; Marques, J; Díez, C; Fernández-Busquets, X (2012). Nanotools for the Delivery of Antimicrobial Peptides *Current Drug Targets* 13:1158-1172.
- Uyterhoeven, E; Butler, C; Ko, D; Elmore, D (2008). Investigating the nucleic acid interactions and antimicrobial mechanism of buforin II. *FEBS Letters* 582:1715-1718.
- Veerman, EC; Nazmi, K; Van't Hof, W; Bolscher, JG; Den Hertog, AL; Nieuw Amerongen, AV (2004). Reactive oxygen species play no role in the candidacidal activity of the salivary antimicrobial peptide histatin 5. *The Biochemical Journal* 381:447-452.
- Viana, A; Pelegrini, P; Grossi-de-Sa, M (2012). Plant biofarming: novel insights for peptide expression in heterologous systems. *Peptide Science* 98:416-427.
- Viana, JF; Dias, SC; Franco, OL; Lacorte, C (2013). Heterologous production of peptides in plants: fusion proteins and beyond. *Curr Protein Peptide Science* 14:568-579.
- Villaverde, A; Carrio, MM (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology Letters* 25:1385-1395.
- Vitale, A; Denecke, J (1999). The endoplasmic reticulum-gateway of the secretory pathway. *Plant, Cell & Environment* 11:615-628.
- Wang, C; Yan, K; Lin, Y; Hsieh, P (2010). Biodegradable core/shell fibers by coaxial electrospinning: processing, fiber characterization, and its application in sustained drug release. *Macromolecules* 43:6389-6397.
- Wang, H; Li, M; Hu, J; Wang, C; Xu, S; Han, C (2013). Multiple targeted drugs carrying biodegradable membrane barrier: anti-adhesion, hemostasis, and anti-infection. *Biomacromolecules* 14:954-961.
- Wang, Y; Zhang, C; Zhang, Q; P., L (2011). Composite electrospun nanomembranes of fish scale collagen peptides/chito-oligosaccharides: antibacterial properties and potential for wound dressing. *International Journal of Nanomedicine* 6:667-676.
- WHO (2011). Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. In: Organization W.H. (ed). World Health Organization: Geneva.
- Williams, KJ; Bax, RP (2009). Challenges in developing new antibacterial drugs. *Current opinion in investigational drugs* 10:157-163.
- Wilson, LS; Reyes, CM; Stolpman, M; Speckman, J; Allen, K; Beney, J (2002). The direct cost and incidence of systemic fungal infections. *Value Health* 5:26-34.

- Wisplinghoff, H; Bischoff, T; Tallent, S; Seifert, H; Wenzel, R; Edmond, M (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases* 39:309-317.
- Xie, Y; Fleming, E; Chen, J; Elmore, D (2011). Effect of proline position on the antimicrobial mechanism of buforin II. *Peptides* 32:677-682.
- Xu, X; Jin, F; Yu, X; Ren, S; Hu, J; Zhang, W (2007). High-level expression of the recombinant hybrid peptide cecropinA(1-8)-magainin2(1-12) with an ubiquitin fusion partner in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 55:175-182.
- Yang, D; Chertov, O; Oppenheim, JJ (2001). The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58:978-989.
- Yang, E; Qin, X; Wang, S (2008). Electrospun crosslinked polyvinyl alcohol membrane. *Materials Letters* 62:3555-3557.
- Ye, XY; Ng, TB (2000). Mungin, a novel cyclophilin-like antifungal protein from the mung bean. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273:1111-1115.
- Yoo, H; Kim, T; Park, T (2009). Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61:1033-1042.
- Yount, NY; Yeaman, MR (2013). Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1277:127-138.
- Zahedi, P; Rezaeian, I; Ranaei-Siadat, S-O; Jafari, S-H; Supaphol, P (2010). A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polymers for Advanced Technologies* 21:77-95.
- Zanetti-Ramos, BG; Creczynski-Pasa, TB (2008). O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e nacional de investimentos. *Revista Brasileira de Farmacologia* 89:95-101.
- Zasloff, M (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389-395.
- Zelena, K; Krugener, S; Lunkenbein, S; Zorn, H; Berger, RG (2009). Functional expression of the lipase gene Lip2 of *Pleurotus sapidus* in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* 31:395-401.
- Zeng, J; Hou, H; Wendorff, JH; Greiner, A (2005). Photo-induced solid-state crosslinking of electrospun poly(vinyl alcohol) fibers. *Macromolecular Rapid Communications* 26:1557-1562.
- Zhang, HT; Wu, J; Zhang, HF; Zhu, QF (2006a). Efflux of potassium ion is an important reason of HL-60 cells apoptosis induced by tachyplesin. *Acta Pharmacologica Sinica* 27:1367-1374.

Zhang, LL; Huang, LH; Zhang, ZX; Hao, DJ; He, BR (2013a). Compatibility of olfactory ensheathing cells with functionalized self-assembling peptide scaffold in vitro. *Chinese Medical Journal* 126:3891-3896.

Zhang, Y; Wang, X; Feng, Y; Li, J; Lim, C; Ramakrishna, S (2006b). Coaxial electrospinning of (fluorescein isothiocyanate-conjugated bovine serum albumin)-encapsulated poly(ϵ -caprolactone) nanofibers for sustained release. *Biomacromolecules* 7:1049-1057.

Zhang, ZH; Wang, XP; Ayman, WY; Munyendo, WL; Lv, HX; Zhou, JP (2013b). Studies on lactoferrin nanoparticles of gambogic acid for oral delivery. *Drug delivery* 20:86-93.

Zhou, L; Zhao, Z; Li, B; Cai, Y; Zhang, S (2009). TrxA mediating fusion expression of antimicrobial peptide CM4 from multiple joined genes in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 64:225-230.

Zhou, M; Hu, Q; Li, Z; Li, D; Chen, CF; Luo, H (2011). Expression of a novel antimicrobial peptide Penaeidin4-1 in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) enhances plant fungal disease resistance. *PloS one* 6:e24677.

Zlotnik, H; Fernandez, MP; Bowers, B; Cabib, E (1984). *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *Journal of Bacteriology* 159:1018-1026.

Zou, Z; Fan, Y; Zhang, C (2011). Preventing protein aggregation by its hyper-acidic fusion cognates in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 80:138-144.